UNIV OF
TORONTO
LIBRARY

Digitized by the Internet Archive
in 2010 with funding from
University of Toronto

http://www.archive.org/details/meddelelser09carl

Chem. & Phys.

COMPTES-RENDUS

DES TRAVAUX

DU

LABORATOIRE DE CARLSBERG

9ME VOLUME.

ÉDITION FRANÇAISE.

1910—1913.

268 113.
26/5/37.

COPENHAGUE

EN COMMISSION CHEZ H. HAGERUP

IMPRIMERIE DE THIELE

1913

TP
500
C35
v.9-10

TABLE DES MATIÈRES DU TOME NEUVIÈME.

Première livraison, 1910.

Page

Sur un indicateur nouveau, α-naphtolphtaléine, ayant un virage au voisinage du point neutre. Par S. P. L. SØRENSEN et S. PALITZSCH 1

Sur le mesurage de la concentration en ions hydrogène de l'eau de mer. Par S. P. L. SØRENSEN et S. PALITZSCH 8

Deuxième livraison, 1911.

EMIL CHRISTIAN HANSEN. Sa vie et son œuvre. Par ALB. KLÖCKER I-XLII

Nouvelles recherches sur la circulation des levures dans la nature. Par EMIL CHR. HANSEN 39

Lignes fondamentales de la classification des Saccharomycètes. Par EMIL CHR. HANSEN 48

Sur les foyers des levures alcooliques situés au-dessus de la surface du sol. Par EMIL CHR. HANSEN 61

Levure haute et levure basse. Etudes sur la variation et l'hérédité. Par EMIL CHR. HANSEN 70

Levure haute et levure basse. Etudes sur la variation et l'hérédité. Deuxième partie. Par EMIL CHR. HANSEN 83

De l'action destructive de l'alcool éthylique sur les bactéries et les levures. Par EMIL CHR. HANSEN 98

Troisième livraison, 1912.

Recherches titrimétriques. Par S. P. L. SØRENSEN et A. C. ANDERSEN 121

1. Sur les substances types en général. Par S. P. L. SØRENSEN 121
2. Sur l'examen de l'oxalate sodique et sur son emploi dans les dosages volumétriques. Par S. P. L. SØRENSEN 135
3. De l'emploi des carbonate et oxalate sodiques comme étalon en acidimétrie. Par S. P. L. SØRENSEN et A. C. ANDERSEN 140

A. Mode opératoire 142

B. Les essais effectués 149

C. Sur la phénolphtaléine et le méthylorange 156

D. Étalonnage d'un acide normal par pesage du chlorure d'hydrogène ou par dosage gravimétrique de la teneur en chlore 161

4. Sur l'emploi des carbonate et oxalate sodiques comme substances types en acidimétrie. Par S. P. L. SØRENSEN 168

5. La méthode de Winkler pour le titrage des hydroxydes alcalins a côté de carbonates alcalins, donne-t-elle des résultats exacts? Par S. P. L. Sørensen et A. C. Andersen 183
A. Dispositif expérimental 185
B. Essais sur le carbonate de sodium desséché d'après Lunge. Les solutions de carbonates alcalins de le Blanc ont-elles été exemptes de bicarbonate? 190
C. Essais faits avec une solution de carbonate potassique renfermant du bicarbonate 195
Sur la concentration optimale des ions hydrogène pour la première phase de la décomposition trypsique de la gélatine («liquéfaction de la gélatine»). Par Sven Palitzsch et L. E. Walbum 200
1. Introduction 200
2. Description de la méthode employée 202
A. Historique 202
B. Influence de divers facteurs sur la précision de la méthode 203
3. Partie expérimentale 207
A. Solutions utilisées 207
B. Mesurage et calcul de la concentration en ions hydrogène et hydroxyle 210
C. Mode opératoire 213
D. Tableaux et Courbes 216
E. Essais sur l'importance des ions hydroxyle pour le temps de solidification 226
4. Quelques remarques sur les résultats 231
Résumé 235

Quatrième livraison, 1913.

On the Proteïd Substances of Barley, in the Grain itself and during the Brewing Processes. By H. Schjerning.
Third Section: Transformation of the Proteïd Matters during Mashing, Boiling of Wort and Fermentation 237
1. Introduction 237
2. The Principal Experiments 238
The Mashing 238
Wort Boiling 256
Fermentation 264
3. Experimental Errors 273
4. Interpretation of Principal Experiments 276
A. General Considerations on the Decomposition of the Proteïd Molecule into less complex Proteïd Individuals and Decomposition Products 276
B. The Extent of Proteïd Decomposition in Malting and Mashing ... 280
C. The Relation of Peptid Splitting to the previously mentioned Proteïd Conversion Processes 291
D. Influence of Mashing Factors on Proteïd Transformation 295
a) Degree of Fineness og Malt Meal 296
b) Concentration of Mash 297
c) Mashing Temperature 300

d) Duration of Initial Mashing 305
e) Duration of Boiling 309
f) Elutriation of Husks 310
g) The Salt Effect 312
E. The Influence exerted on Proteïd Transformation by Wort Boiling 329
a) Duration of Boiling 332
b) The Proportion of Hops 340
c) The Temperature or Pressure during Boiling 345
d) The Concentration of the Wort 351
e) The Importance of Oxygen in Wort Boiling 355
f) The Kind of Hops 359
F. Fermentation 363
a) Primary Fermentation 367
b) Secondary Fermentation 384
G. Principal Results 387

SUR UN INDICATEUR NOUVEAU, α-NAPHTOLPHTALÉINE, AYANT UN VIRAGE AU VOISINAGE DU POINT NEUTRE.

PAR

S. P. L. SØRENSEN ET S. PALITZCH.

Dans un mémoire antérieur[1]) nous avons signalé le grand intérêt qu'il y aurait à compléter convenablement les indicateurs des mélanges de phosphates, vu que pour les plus alcalins de ces mélanges il n'y a qu'un seul indicateur qui soit utilisable, à savoir l'acide α-naphtol-azo-parabenzènesulfonique. Cet indicateur, dont la région de virage s'étend très avant dans le domaine du groupe des phtaléines, paraît pouvoir servir même en présence de substances protéiques naturelles; malheureusement, cependant, le virage qu'il présente, ne possède pas la netteté désirable.

Dans quelques mesurages colorimétriques qui seront décrits dans un mémoire faisant suite à celui-ci, mesurages qui portent sur un certain nombre d'échantillons d'eau de mer dont les concentrations en ions hydrogène se trouvaient souvent dans la région sus-indiquée, le manque d'un indicateur approprié et présentant un virage bien accusé, s'est fait vivement sentir. C'est pourquoi nous avons cherché un nouvel indicateur capable de remplacer, dans la série des indicateurs, le numéro 16: acide α-naphtol-azo-parabenzènesulfonique[2]). Et nous en avons trouvé un parfaitement approprié dans l'α-naphtolphtaléine, qui se rattache de façon naturelle aux phtaléines du phénol et du thymol; seulement, par opposition à celles-ci — et plus particulièrement à celle du thymol —, qui ont leur zone de virage à une réaction franchement alcaline, la région de virage de notre nouvel indicateur atteint presque le point neutre (voir p. 6).

[1]) S. P. L. Sørensen: Comptes-rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg **8**, 112 (1909).

[2]) Au même endroit, p. 117.

L'*α*-naphtolphtaléine fut préparée, en 1871, par Julian Grabowski[1]) par chauffage de chlorure de phtalyle et d'*α*-naphtol, puis extraction au moyen de lessive de potasse de la matière verte ainsi formée, précipitation fractionnée de la solution par l'acide chlorhydrique, et enfin recristallisation du produit dans le benzène. Les petits cristaux bruns formés de cette manière et qui pouvaient se dissoudre dans la lessive de potasse en donnant une belle couleur bleue, accusaient après dessiccation à une température de 100° à 110°, la constitution $C_{28}H_{18}O_4 + {}^1/_2 H_2O$. En dehors de cette communication assez laconique de Grabowski (elle ne comporte, en tout, que quinze lignes), nous n'avons, dans la bibliographie chimique, rien trouvé concernant ce composé.

Dans la préparation de l'*α*-naphtolphtaléine nous avons suivi les indications de Grabowski. Voici comment nous avons opéré:

${}^1/_4$ molécule-gramme d'*α*-naphtol (36 g.) et ${}^1/_8$ molécule-gramme de chlorure de phtalyle (25 g.) furent bien triturés ensemble dans une capsule en porcelaine de la capacité de 2 l., ce qui donna lieu, dès la température ordinaire du laboratoire, à un abondant dégagement de chlorure d'hydrogène. Après avoir laissé le mélange pendant un quart d'heure à la température ordinaire, on le soumit pendant une demi-heure à la chaleur du bain-marie faiblement bouillant, que finalement on porta, pendant une demi-heure, à une ébullition forte, en remuant bien de temps à autre toute la matière, qui au cours de cette opération devint de plus en plus consistante.

Ensuite on versa sur le produit de la réaction 1 l. d'eau et 100 cc. de lessive de soude 2-normale, après quoi on chauffa lentement au bain-marie. L'*α*-naphtolphtaléine qui s'était formée, entra alors en solution en donnant une couleur bleue foncée, tandis qu'il restait une matière rouge brun, qui fondit peu à peu au cours du chauffage. Après un quart d'heure de chauffage au bain-marie bouillant, en bien agitant la matière fondue et non dissoute, on refroidit le tout dans l'eau froide, et puis, après avoir séparé par filtration le résidu maintenant complètement solidifié, on lava deux fois avec un peu d'eau. Après avoir réduit en poudre le produit rouge brun resté indissous et qui renfermait encore un peu d'*α*-naphtolphtaléine, et y versé dessus 1 l. d'eau

[1]) Berichte der d. chem. Ges. **4**, 725.

et 50 cc. de lessive de soude 2-normale, on chauffa de nouveau lentement et en remuant continuellement, au bain-marie d'abord faiblement et enfin fortement bouillant. Après refroidissement, puis filtration de la solution bleue, on ajouta celle-ci à la portion principale. Le résidu indissous fut traité encore deux fois de la même manière, chaque fois avec 1 l. d'eau et 50 cc. de lessive de soude 2-normale.

Après ce dernier traitement, le reste rouge indissous avait à l'état pulvérisé, puis desséché à l'air, un poids de 15 g. Il doit renfermer entre autres l'α-naphtolfluorane formée au cours de la réaction; on n'y pouvait déceler que de très faibles proportions d'α-naphtolphtaléine.

Après avoir mélangé les solutions bleues et fortement alcalines de l'α-naphtolphtaléine, on y a ajouté, en bien agitant, 400 cc. d'acide chlorhydrique demi-normale, ce qui ne donna lieu à aucun précipité persistant. Après avoir fait traverser le liquide par un courant d'acide carbonique, on a vu la naphtolphtaléine se séparer petit à petit sous la forme d'un volumineux dépôt rougeâtre, tandis que l'acide phtalique formé dans la réaction restait en solution. La matière colorante précipitée fut séparée à la trompe de l'eau-mère jaune tirant sur le rouge, et puis on la lava bien à l'eau chargée d'acide carbonique. Pour mieux la purifier, on la fit dissoudre dans $^1/_2$ l. d'eau de baryte saturée à froid; on sépara par filtration un peu de sels barytiques insolubles, et le liquide bleu foncé fut sursaturé légèrement d'acide chlorhydrique; après avoir essoré à la trompe le précipité rougeâtre, on le débarrassa de son chlore en lavant à l'eau, et finalement on dessécha à l'air. Rendement: 11 gr.

La préparation ainsi obtenue est suffisamment pure pour pouvoir servir d'indicateur dans beaucoup de cas; toutefois elle renferme encore un peu d'α-naphtol et d'autres impuretés facilement solubles dans la benzène, ainsi qu'une faible proportion d'une substance très peu soluble dans ce dissolvant, et qui se dissout dans les alcalis en donnant non pas une couleur bleue, mais une couleur verte.

Pour achever la purification, on traita au benzène dans un appareil Soxhlet. Les premiers extraits, qui renfermaient les impuretés facilement solubles, furent jetés. L'α-naphtolphtaléine n'entra que lentement en dissolution et se rassembla peu à peu sous la forme d'une croûte crystalline au fond du matras. Comme la matière avait une tendance à suinter dans le filtre cylindrique, il fallut la dissoudre quelques fois dans l'alcool, puis évaporer la

solution à siccité au bain-marie; le résidu se laissa triturer avec le benzène, et put alors être introduit dans un nouveau filtre cylindrique. On continua le procédé d'extraction jusqu'à ce que, après dissolution dans l'alcool, dilution avec de l'eau et addition d'un peu de lessive de soude, un petit échantillon du résidu donna une couleur verte au lieu d'une couleur bleue.

L'extraction terminée, le benzène fut décanté, et l'on fit dissoudre dans l'alcool la croûte cristalline. Après avoir évaporé cette solution à siccité, on réduisit en poudre le résidu, qu'on tritura et lava deux fois au benzène pour le sécher enfin, d'abord à l'air et ensuite jusqu'à poids constant dans le vide à 100° à 110°. Rendement: 4 à 5 g.

La matière ainsi traitée apparut sous forme d'une poudre, dont la couleur allait du rouge pâle au rouge grisâtre, et qui contenait encore une très faible proportion de cendres; du reste, la constitution de ce corps a été reconnue comme répondant à la formule de la naphtolphtaléine anhydre:

$$C_6H_4 < \begin{matrix} C \\ CO \end{matrix} > \overset{(C_{10}H_6OH)_2}{O}$$

0g.1064 de matière a donné par combustion 0g.0419 d'eau, 0g.3114 d'acide carbonique et 0g.0005 de cendres, ce qui, calculé sur la matière dépourvue des cendres, correspond à 4.43 % d'hydrogène et 80.20 % de carbone.

De la même manière, 0g.1274 de matière a donné 0g.0505 d'eau (4.45 % d'hydrogène), 0g.3729 d'acide carbonique (80.14 % de carbone) et 0g.0006 de cendres.

		Calculé	Trouvé	
C_{28}	330.00 . . .	80.36	80.20	80.14
H_{18}	18.14 . . .	4.34	4.43	4.45
O_4	64.00 . . .	15.30		
	418.14 . . .	100.00		

Ainsi, la matière desséchée dans le vide à 100° à 110°, est exempte d'eau; séchée à l'air, elle ne renferme également pas d'eau (comparez la formule de J. Grabowski donnée ci-dessus et indiquant une demi-molécule d'eau de cristallisation), mais par contre du benzène de cristallisation. Une partie de celui-ci se perd déjà par exposition à l'air ou par abandon dans un verre; le benzène s'élimine un peu plus vite par dessiccation dans le vide à la température ordinaire, mais l'élimination n'est complète que lorsque dans ces conditions on porte la température

à 100° à 110°. La perte la plus élevée de poids que nous avons observée dans cette dessiccation, a été de 15.42 %; ordinairement elle est de beaucoup moindre. Pour 1 molécule de benzène la perte se calcule à 15.73 %.

Qu'il s'agisse bien ici d'une perte de benzène et non d'eau, d'alcool ou d'un autre corps contenant de l'oxygène, nous le déduisons de ce fait qu'avant la dessiccation, la substance est plus riche en carbone et en hydrogène, et, par conséquent, moins riche en oxygène qu'elle ne l'est après. A titre d'exemple, nous pouvons mentionner qu'une préparation dont le poids par la dessiccation diminuait de 3.89 %, s'est trouvée contenir avant celle-ci:

a) 4.78 % d'hydrogène et 80.86 % de carbone
et b) 4.76 % — et 80.90 % —

La composition d'une naphtolphtaléine ayant une teneur en benzène de 3.89 %, se calcule à

4.47 % d'hydrogène et 80.82 % de carbone.

L'*a*-naphtolphtaléine débarrassée de benzène fondit en cinq secondes au «bloc Maquenne» à une température de 253° à 255°.

Il est encore à remarquer que la solution de la matière dans le benzène est de couleur jaune rouge, tandis que la poudre humectée avec du benzène est d'un rouge violet, et celle séchée à l'air d'un gris violet; ce n'est qu'après élimination de la totalité du benzène que la teinte vire au rouge pâle ou rouge grisâtre

Comme liqueur indicatrice nous nous servons d'une solution de 0g.1 de naphtolphtaléine (séchée dans le vide à 100° à 110°) dans 150 cc. d'alcool + 100 cc. d'eau. Pour 10 cc. de liqueur expérimentale on emploie 4 à 12 gouttes, ordinairement 8 gouttes.

En présence de cette indicateur, les liquides franchement acides sont presque incolores, tandis que les solutions légèrement acides acquièrent une coloration rougeâtre, les solutions faiblement alcalines une teinte verdâtre, et celles plus fortement alcalines une couleur d'un bleu pur.

Avec 8 gouttes de la liqueur indicatrice

«1 sec.»[1]) est incolore, ou peu s'en faut;
«2 sec.» prend une nuance jaunâtre ou rougeâtre, qui augmente d'intensité jusqu'à
«7,5 sec.», où l'on perçoit en même temps un reflet verdâtre.

[1]) Ces mêmes Comptes-rendus **8**, 42, 68 et 399 (1909).

Composition de la solution examinée	Coloration des liqueurs de comparaison	Trouvé par voie électrométrique p_H^+	Mesurage colorimétrique avec l'α-naphtolphtaléine (7.3 à 8.7) p_H^+	Observations
Solution de gélatine à 2% + phosphate + NaOH + NaCl Chlorure 0.1 norm.)	2 gtt. de brun Bismarck 2 gtt. d'hélianthine II	7.49	7.45	Virage excellent.
—	—	7.77	7.73	—
Solution à 2% de peptone Witte + NaOH + NaCl (Chlorure 0.1 norm.)	2 gtt. de brun Bismarck 3 gtt. d'hélianthine II	7.80	7.71	—
—	3 gtt. de brun Bismarck 3 gtt. d'hélianthine II 1 gt. de $BaSO_4$	7.82	7.70	—
Solution à 2% de blanc d'œuf de poule partiellement digéré à la pepsine + NaOH + NaCl (Chlorure 0.1 norm.)	2 gtt. d'hélianthine II	7.64	7.56	—
—	—	8.11	8.04	—
Solution à 2% de caséine partiellement digérée à la pepsine + NaOH + NaCl (Chlorure 0.1 norm.)	1 gt. de brun Bismarck	7.73	7.66	—
—	—	8.11	8.16	—
Solution à 2% de blanc d'œuf de poule naturel + NaOH + NaCl (Chlorure 0.1 norm.)	1 gt. de brun Bismarck 2 gtt. d'hélianthine II	8.69	8.39	Additionnés de doses égales (8 gtt.) de liqueur indicatrice, les liquides expérimentés accusaient une coloration sensiblement moins intense que ceux de comparaison; ce n'est qu'un excès de 2 à 4 gtt. qui leur a donné la même intensité.
—	—	8.79	8.71	
—	—	8.78	8.24	
Solution à 2% de caséine + NaOH + NaCl (Chlorure 0.1 norm.)	1/2 gt. de brun Bismarck 1 gt. de $BaSO_4$	8.54	7.78	

Pour les mélanges plus alcalins de phosphates ainsi que pour les mélanges correspondants de borates, la coloration vire en passant par de belles nuances très caractéristiques (vert d'olive — vert pur — vert tirant sur le bleu — bleu tirant sur le vert) jusqu'à «8 borate + HCl», qui présente un bleu presque pur.

L'indicateur accuse un bon virage entre «7.5 sec.» ($p_H^+ = 7.26$) et «7.0 borate + HCl» ($p_H^+ = 8.68$).

Les sources d'erreur que comporte cet indicateur, sont de la même nature et de la même importance que dans le cas de la phénolphtaléine. Pour ce qui concerne l'influence des sels neutres

ainsi que pour les modifications de l'intensité ou de la nuance de la coloration indicatrice, nous renvoyons nos lecteurs au mémoire faisant suite à celui-ci[1]).

Dans le but de rechercher quelle est l'influence exercée par le toluène ou le chloroforme, nous avons employé le procédé décrit antérieurement[2]), en utilisant le mélange «9.1 sec.», d'un côté, et de l'autre, le mélange «6.0 borate + HCl». On n'a pu trouver aucune différence entre les mélanges non traités et ceux qui, avant l'addition de l'indicateur, avaient été secoués avec le toluène ou le chloroforme, puis filtrés. En secouant en présence d'abondantes doses de toluène ou de chloroforme, l'indicateur se laissa pourtant extraire à peu près complètement de la solution.

Quant à l'influence des protéines et de leurs produits de décomposition, nous renvoyons au tableau ci-contre, où nous avons réuni les résultats de quelques mesurages comparés électrométriques et colorimétriques.

Il ressort de ce tableau qu'au point de vue en question, l'*α*-naphtolphtaléine se comporte de la même manière que les deux phtaléines antérieurement examinées, celles du phénol et du thymol[3]). Dans les essais où la naphtolphtaléine n'était en présence que de produits de décomposition de protéines, l'indicateur se montrait parfaitement utilisable, alors que les protéines naturelles étaient susceptibles de donner lieu à des erreurs importantes dans les mesurages colorimétriques. Ainsi qu'on peut le remarquer dans le tableau, les protéines naturelles semblent se combiner avec une partie de l'indicateur ajouté pour donner naissance à des corps incolores ou légèrement colorés, de sorte que — pour que l'on puisse faire entrer la solution protéique parmi les liqueurs de comparaison — il faut ajouter à celle-là une plus grande dose d'indicateur qu'à celles-ci. Il va de soi que ce fait seul suffit à rendre impossible un mesurage précis.

Février 1910.

[1]) Ces mêmes Comptes-rendus **9**, 19 et 32 (1910).
[2]) Ces mêmes Comptes-rendus **8**, 77, (1909).
[3]) Ces mêmes Comptes-rendus **8**, 113 (1909).

SUR LE MESURAGE DE LA CONCENTRATION EN IONS HYDROGÈNE DE L'EAU DE MER.

PAR

S. P. L. SØRENSEN ET S. PALITZSCH.

Ainsi que nous l'avons signalé à diverses reprises dans un précédent mémoire sur l'importance de la concentration en ions hydrogène pour les réactions enzymatiques[1]), il ne peut guère y avoir de doute que la grandeur de la concentration en ions hydrogène ne soit un facteur avec lequel il faut compter dans toutes les réactions biologiques.

C'est ainsi que pour pouvoir approfondir l'étude de la biologie de l'eau de mer, il importe certainement de connaître la concentration en ions hydrogène de cette eau. Aussi nous sommes-nous rendus avec un vif plaisir à une demande que nous avaient adressée MM. le docteur O. Pettersson, professeur à l'université de Stockholm, et le professeur M. Knudsen, à Copenhague, membres du *Conseil permanent international pour l'exploration de la mer*, d'élaborer une méthode à l'aide de laquelle la concentration ionique de l'eau de mer puisse être déterminée d'une façon facile et en même temps précise autant que possible.

Étant donné que la concentration en ions hydrogène de l'eau de mer se trouve toujours assez rapprochée du point neutre, il s'ensuit que parmi les diverses méthodes de mesurage à nous connues, deux seules peuvent être employées, à savoir le procédé électrométrique et le procédé colorimétrique. Le principe de ces deux méthodes ainsi que les détails de leur application, sont exposés dans le mémoire ci-dessus cité de S. P. L. Sørensen. Aussi pouvons-nous nous borner à renvoyer à ce

[1]) S. P. L. Sørensen: Études enzymatiques. II. Comptes-rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg **8**, 1. (1909).

mémoire que, pour simplifier, nous désignons dans la suite par «Ét. II».

Le mélange de carbonates acides et normaux contenus dans l'eau de mer, protège contre les changements trop grands et trop brusques auxquels, en leur absence, la concentration en ions hydrogène serait sujette. Sans un pareil «tampon» («Ét. II», p. 54), un apport même minime d'acides ou de bases, donnerait lieu à un changement extrêmement important de ladite concentration. Voilà précisément ce qu'empêche la présence du mélange de carbonates: l'acide ou la base apportés étant fixés avec libération ou fixation d'une quantité équivalente d'acide carbonique, donnent lieu à une modification bien moins importante de la concentration ionique. Néanmoins l'absorption de quantités même peu considérables de l'acide carbonique de l'air, ou bien l'abandon d'un peu d'acide carbonique à l'air, provoquera ordinairement un changement très sensible de la concentration en ions hydrogène. Il est, en conséquence, nécessaire de procéder au mesurage de cette concentration à l'instant même où l'on prélève l'échantillon d'eau de mer, de manière à éviter la modification de la concentration ionique qui pourrait être occasionnée soit par un échappement ou une absorption d'acide carbonique, soit, pendant la conservation, par une dissolution de quelques ingrédients du verre. Par conséquent, le mesurage doit être effectué à bord, et de ce fait même il sera peu pratique d'employer la méthode électrométrique. Nous faisons encore observer qu'une solution saline telle que l'eau de mer, qui renferme de l'acide carbonique et des carbonates, ne se laisse pas mesurer avec précision par le procédé électrométrique habituel, d'après lequel il faudrait la faire traverser par un courant d'hydrogène. Quelques exemples cités dans la partie expérimentale du présent mémoire (voir page 24) feront voir que l'eau de mer se comporte sous ce rapport tout à fait de la même manière qu'une solution de bicarbonate sodique (voir «Ét. II», p. 57), solution qui au cours du mesurage électrométrique deviendra de plus en plus alcaline, parce que l'acide carbonique est expulsé peu à peu par l'hydrogène.

Les choses se présentent un peu mieux lorsqu'on emploie la méthode électrométrique sous une forme légèrement modifiée (voir «Ét. II», p. 59): Au début de l'expérience, on remplit entièrement le vase électrolytique avec le liquide à examiner, et

après avoir fermé le vase hermétiquement, on y fait affluer une quantité d'hydrogène suffisante pour faire tomber le liquide jusqu'à un point déterminé, de manière à ce qu'une partie de l'électrode en platine soit entourée d'hydrogène. De cette façon on évite que des quantités sensibles d'acide carbonique ne s'en échappent; mais ordinairement il faut un temps très long (six à huit heures, ou même davantage) avant que la force électromotrice devienne constante. W. E. Ringer[1]), le seul savant qui se soit occupé du mesurage de la concentration en ions hydrogène de l'eau de mer, fait usage d'un pareil procédé en prolongeant le mesurage jusqu'à vingt-quatre heures, afin d'être sûr d'avoir obtenu une force électromotrice constante.

Le mesurage colorimétrique est d'une exécution de beaucoup plus commode et rapide; mais il est dans la nature même de cette méthode, qu'au point de vue de la précision, elle est inférieure au mesurage électrométrique, pourvu que le liquide à examiner n'offre pas de difficultés qui rendent impossible une mesure électrométrique précise (v. «Ét. II», p. 57). Il est à considérer, en outre, que le liquide particulier du mesurage duquel il est question dans la présente étude, renferme des quantités abondantes et d'ailleurs variables de sel marin, qui donne lieu à une erreur plus ou moins grande (v. «Ét. II», p. 75) lors du mesurage colorimétrique.

D'un autre côté, il convient de faire remarquer que l'eau de mer, étant incolore, se prête parfaitement au mesurage par voie colorimétrique, et enfin on dispose actuellement d'une série complète de réactifs indicateurs excellents[2]) présentant des virages bien nets pour les concentrations ioniques dont il est question dans les recherches sur l'eau salée. Si, dans ces conditions, qui sous tous les autres rapports sont si favorables au mesurage colorimétrique, on pouvait réussir à éliminer l'erreur provenant des sels, ou bien à introduire une correction précise de cette erreur, la source d'erreur méthodique la plus importante du mesurage colorimétrique se trouverait écartée. On n'aurait alors, d'une façon générale, à compter qu'avec la source d'erreur que comporte l'application de la méthode et qui provient de la

[1]) Verhandelingen uit het Rijksinstituut voor het onderzoek der zee. 1908. (Gebroeders van Cleef, te 'S-Gravenhage).

[2]) Voir le mémoire précédent: «Sur un indicateur nouveau. α-naphtolphtaléine, présentant un virage aux environs du point neutre».

difficulté d'une comparaison exacte entre les différentes nuances ou intensités de couleur. Cependant, dans les conditions en question (solutions incolores se prêtant excellemment au mesurage colorimétrique, indicateurs très précis), le manque de précision dont le mesurage colorimétrique est entaché à cause de cette source d'erreur, est si minime que la faute ne dépasse ordinairement pas $\pm$ 0.05, et qu'en tout cas elle n'atteindra jamais $\pm$ 0.10 dans l'exposant des ions hydrogène («Ét. II», p. 88).

La méthode que nous avons élaborée pour le mesurage de la concentration en ions hydrogène de l'eau de mer, est basée sur une élimination de l'erreur que la présence des sels est susceptible d'entraîner dans le mesurage colorimétrique (voir «Ét. II», p. 67). Nous nous servons, comme liqueurs de comparaison, de mélanges de phosphates et de borates, et comme indicateurs, de p-nitrophénol, de rouge neutre, de α-naphtolphtaléine et de phénolphtaléine. Pour déterminer l'erreur provenant des sels en présence de ces indicateurs, nous avons suivi le procédé brièvement décrit dans le travail de S. P. L. Sørensen cité plus haut (p. 59). Un échantillon d'eau de mer, ayant une teneur en sel connue, a été rendu faiblement mais nettement acide en y ajoutant un peu d'acide chlorhydrique normal au $^1/_5$, sur quoi on a expulsé l'acide carbonique au moyen d'un courant d'hydrogène. Par neutralisation totale ou partielle au moyen d'une lessive de soude normale au $^1/_5$ et exempte d'acide carbonique, puis addition d'une petite dose d'un tampon approprié (mélange de citrates ou de borates), on est arrivé à fixer à souhait et à maintenir constante durant toute l'expérience la grandeur de la concentration en ions hydrogène, ce qui a permis de mesurer, tant électrométriquement que par colorimétrie, l'eau ainsi traitée. La différence entre les deux mesures représentait alors l'erreur attribuable aux sels: en effet, la dilution de l'eau aussi bien que l'action saline des petites doses d'acide chlorhydrique, de lessive de soude et de tampon, pouvaient être négligées, parce que la correction nécessitée par ces agents ne pouvait se monter qu'à 0.01 au plus, dans la valeur de l'exposant des ions hydrogène. Quant aux détails de notre procédé, ils seront mis en lumière par quelques exemples cités dans la partie expérimentale du présent travail.

Étant donné que, même pour les eaux les plus salées et en employant des indicateurs sensibles aux sels: «l'erreur de sel»

est toujours assez insignifiante d'environ 0.1 à 0.2 dans la valeur de l'exposant des ions hydrogène, il s'ensuit qu'une légère modification, soit de quelques pour mille, dans la teneur en sel, se fera à peine sentir, ou pas du tout, dans la grandeur de cette erreur, le mesurage colorimétrique n'étant pas suffisamment délicat pour la déceler. Par conséquent, lorsqu'il s'agit d'évaluer la grandeur de l'erreur de sel, il ne serait guère pratique de choisir une série d'échantillons d'eau de mer ayant chacun une teneur différente en sel, attendu que l'erreur relativement grande dont chaque détermination en particulier serait entachée, pourrait rendre difficile une vue d'ensemble.

Aussi avons nous choisi une autre voie, que nous croyons meilleure: nous avons fait porter nos déterminations exclusivement sur des eaux de mer ayant, d'un côté, une teneur en sels d'environ 35 pour mille et, de l'autre, de 20 pour mille environ. C'est ce qui nous a permis de déterminer un grand nombre de fois l'erreur de sel pour une même teneur en sel, en sorte que la moyenne trouvée n'est certainement entachée que d'erreurs tout à fait négligeables. Nous avons examiné avec des soins particuliers les eaux de mer contenant environ 35 pour mille de sel, parce que, d'un côté, la majeure partie de l'eau de mer a approximativement cette teneur en sels et que, d'un autre côté, il y a un interêt spécial à déterminer aussi exactement que possible la limite supérieure, y correspondant, de l'erreur de sel. Pour ces essais nous avons utilisé des échantillons provenant de points très éloignés les uns des autres de l'océan Atlantique ainsi que des eaux voisines.

En même temps nous avons, comme cela a été dit plus haut, déterminé l'erreur de sel en entreprenant des mesurages dans un certain nombre d'échantillons d'eau contenant environ 20 pour mille de sel, échantillons prélevés dans la partie la plus occidentale de la mer Baltique et qui étaient les moins salés de tous ceux dont nous avons pu disposer. Les résultats numériques consignés dans la partie expérimentale feront voir que l'erreur de sel est un peu moindre pour l'eau à 20 pour mille que pour celle à 35 pour mille; mais d'autre part, la différence est si petite qu'on peut aisément faire une interpolation exacte pour les teneurs intermédiaires, et l'on peut également sans erreur appréciable introduire une extrapolation convenable pour une teneur en sel inférieure à 20 pour mille (voir p. 19 et 31, Note).

Il va sans dire que l'erreur de sel est de grandeur différente et que, par conséquent, il a fallu la déterminer séparément pour chacun des indicateurs employés. On devait également s'attendre à ce que, pour un même indicateur et pour un même échantillon d'eau, l'erreur se trouvât être dépendante de la nature des liqueurs de comparaison utilisées. Aussi, dans le seul cas où nous avons été obligés d'employer deux sortes différentes de liqueurs de comparaison en présence d'un même indicateur (mélanges de phosphates et de borates avec l'indicateur *a*-naphtolphtaléine), a-t-on pu constater que l'erreur en question était de grandeur différente pour les deux liqueurs. Par contre, nous n'avons pu constater avec certitude, dans la grandeur de cette erreur, aucune modification attribuable à la composition différente et à la concentration ionique différente des liqueurs comparatives d'un même type; ainsi nous avons, par exemple, trouvé la même erreur pour le p-nitrophénol soit que l'échantillon d'eau soumis au mesurage fût situé à «1 sec.» ou à «3 sec.» (voir «Ét. II», p. 68). C'est pourquoi, en déterminant l'erreur de sel, nous avons toujours cherché à fixer la concentration ionique de la solution de façon à ce que l'indicateur dont il s'agissait de trouver l'erreur de sel, présentât pour cette concentration un virage satisfaisant (comparez p. 27, Note).

Après avoir déterminé l'erreur de sel des différents indicateurs, nous avons pu introduire la correction nécessaire dans le mesurage colorimétrique de la concentration en ions hydrogène. Pour faciliter la compréhension du procédé que nous avons adopté, nous allons citer un exemple:

Ainsi qu'on le verra dans la partie expérimentale de ce mémoire (voir p. 19), la correction relative a l'erreur de sel entachant la mesure colorimétrique d'eau de mer à 35 pour mille, est égale à $-\div 0.12$, si l'on se sert de p-nitrophénol comme indicateur et de mélanges de phosphates comme liqueurs de comparaison; c'est-à-dire qu'une eau de mer dont l'exposant réel des ions hydrogène, p_H^+ (trouvé par un mesurage électrométrique précis), est, par exemple, de 6.12, accusera dans le mesurage colorimétrique la même intensité de couleur que «2 sec.», dont l'exposant des ions hydrogène est de 6.24 (voir «Ét. II», p. 42). Par conséquent, le mesurage colorimétrique donnera un résultat exact, si, pour la liqueur de comparaison «2.0 sec.», on compte non

pas avec l'exposant ionique réel (6.24), mais avec celui corrigé relativement à l'erreur de sel (6.24 ÷ 0.12 = 6.12).

Dans la suite on en trouvera reunies sous forme de tableau, pour chaque indicateur en particulier, les valeurs non corrigées, d'un côte, et de l'autre, celles corrigees relativement a l'erreur de sel, tant pour une teneur de 35 pour mille que pour une teneur de 20 pour mille de sel; les valeurs se rapportent aux diverses liqueurs de comparaison utilisables en présence de l'indicateur considéré.

Le mesurage colorimétrique d'un échantillon donné d'eau de mer, sera alors fait par le procede habituel decrit en détail dans le memoire de S. P. L. Sorensen (p. 67 a 72); seulement on se servira non des valeurs non corrigées, mais, au contraire, des valeurs corrigees des exposants des ions hydrogènes des liqueurs de comparaison; quant a la question de savoir s'il faut utiliser la valeur corrigee pour 35 pour mille de sel ou celle corrigée pour 20 pour mille de sel ou bien peut-être pour une valeur intermédiaire ou située au dehors, elle dépend de la teneur en sel de l'eau a examiner. Nous admettons comme évident que l'acide carbonique et les carbonates n'ont aucune importance particulière dans le mesurage colorimétrique au delà du fait que, de même que les autres composants de l'eau de mer, ils concourent à déterminer la valeur de la concentration ionique. Par conséquent, le mesurage colorimétrique de cette eau peut, comme il a été dit plus haut, être exécuté tout a fait de la manière ordinaire; seulement il ne faut pas perdre de vue le fait signalé ci-dessus (voir p. 9), a savoir que l'eau salée ne renferme pas d'autre tampon que l'acide carbonique et les carbonates y contenus, et que, par suite, la concentration en ions hydrogène subit des modifications, si la teneur en acide carbonique augmente ou diminue. C'est pourquoi, ainsi qu'on l'a vu dans ce qui précède, il faut effectuer à bord le mesurage de la concentration ionique, immédiatement après avoir prelevé l'échantillon; c'est pourquoi aussi les éprouvettes dans lesquelles on met l'eau à mesurer, doivent être, autant que possible, tenues fermées avec un bouchon.

En ce qui concerne les mesures sur lesquelles sont fondées les corrections dues a l'erreur de sel, nous renvoyons nos lecteurs au tableau 6 (p. 22). Il est a noter que tous ces mesurages ont été operes sur de l'eau de mer dont la concentration ionique etait maintenue constante pendant la durée de l'expérience, l'acide

carbonique ayant été expulsé préalablement et remplacé par un tampon approprié. Nous sommes donc en droit d'admettre que dans ces conditions les mesures électrométriques présentent un degré tout particulier de précision.

Si maintenant on compare les valeurs de p_H^+ trouvées par mesurage électrométrique avec celles obtenues par voie colorimétrique, en employant les valeurs contenues dans les tableaux 1 à 5 et corrigées relativement à l'erreur de sel, des exposants des ions hydrogène des liqueurs de comparaison (voir les trois dernières colonnes du tableau 6), nous voyons que l'écart ne dépasse jamais $\pm$ 0.05 et qu'ordinairement il est bien au-dessous. Comme, en mesurant colorimétriquement d'après notre système la concentration des ions hydrogène de l'eau de mer, on peut compter avec un degré de précision à peu près égal, nous croyons pouvoir en conclure que l'erreur à laquelle donne lieu un pareil mesurage exécuté avec tous les soins requis, ne sera jamais supérieure à $\pm$ 0.1 dans la valeur de l'exposant des ions hydrogène, et que le plus souvent elle sera de beaucoup moindre.

L'examen des mesures colorimétriques d'eaux de mer prélevées directement sur les bouteilles dans lesquelles on les avait conservées, viendra à l'appui de cette conclusion. Les tableaux 7 à 10 (p. 25 à 29) renferment çà et là un assez grand nombre de mesures doubles, où une même eau était mesurée en employant deux indicateurs différents ou des liqueurs de comparaison de deux types différents: dans aucun cas l'écart entre deux mesures corrélatives ne dépasse 0.07 dans la valeur de l'exposant des ions hydrogène; ordinairement il est de beaucoup moindre que ce chiffre (voir p. 27).

Partie expérimentale

Les échantillons d'eau de mer à examiner étaient les suivants:

I. Une série d'échantillons portant les numéros 1 à 44, prélevés par MM. J. P. Jacobsen, licencié-ès-sciences, et H. J. Nielsen, mécanicien, au cours d'expéditions des navires «C. F. Grove» et «Falken» dans les eaux danoises en deçà du Skager-Rack du 1er au 5 février 1909. Les échantillons avaient été recueillis dans des bouteilles vertes ordinaires.

II. Une série d'échantillons allant du numéro 50 à 73, prélevés par M. Willassen, second à bord du vapeur «Laura» en

voyage de Copenhague en Islande du 28 février au 24 mars 1909. Les bouteilles étaient de la même sorte que celles de la série I.

III. Une série d'échantillons allant de 74 à 98, prélevés par M. Schmith, second à bord du vapeur «United States», pendant son voyage de Copenhague à New-York (du 27 février à 8 mars 1909). Bouteilles de même sorte que dans les deux séries précédentes.

IV. Une série d'échantillons portant les numéros 101 à 120, prélevés par M. le docteur Johs. Schmidt à bord du navire «Thor», au cours d'un voyage de la Méditerranée en Danemark. Ces échantillons étaient conservés dans des bouteilles à eau gazeuse d'un demi-litre et faites de verre bleuâtre; toutefois quelques-unes de ces bouteilles étaient incolores et faites manifestement d'une autre sorte de verre (voir p. 27). Tous ces échantillons étaient en double (marqués a ou b).

Les échantillons indiqués en II, III et IV, provenaient tous de la surface de l'eau, tandis que ceux pris dans les eaux danoises avaient été enlevés à des profondeurs variant de 0 à 90 mètres.

Pour expliquer le procédé d'après lequel nous avons établi les corrections relatives à l'erreur de sel, nous allons exposer les mesurages portant sur un seul des échantillons ci-dessus énumérés.

Eau prélevée sur la mer Atlantique, N° 93, teneur en sel 35.59 pour mille.

On a mélangé 610 centimètres cubes d'eau avec 11 cc. d'acide chlorhydrique normal au $^1/_5$. La solution ainsi obtenue est devenue d'une réaction fortement acide ($p_H^+ = 2.83$; mesure colorimétrique au moyen de l'acide benzylanilino-azo-parabenzènesulfonique). Ensuite, on l'a débarrassée de son acide carbonique en la faisant traverser, du jour au lendemain, par un courant d'hydrogène.

a) p-nitrophénol; mélanges de phosphates.

A 150 cc. de l'eau débarrassée de l'acide carbonique, on a ajouté d'abord $4^{cc}.5$ de lessive norm. au $^1/_5$ de soude, et puis, afin de fixer la concentration en ions hydrogène, $7^{cc}.5$ de citrate[1]) («Ét. II», p. 35).

Le mesurage électrométrique put alors (comp. p. 24) être effectué avec précision. Dès qu'on eut fait passer l'hydrogène pendant 20 minutes, la force électromotrice était devenue à peu près con-

[1]) Il serait logique d'employer, comme tampons, des mélanges de phosphate; cependant cela ne nous a pas été possible, parce que ces mélanges, et surtout ceux qui sont relativement alcalins, donnent lieu à la formation d'un précipité.

stante, et la valeur de π trouvée après une heure d'hydrogénation ne subit pas de changement pendant les cinq quarts d'heures suivants.

Trouvé: $\pi = 0.6814$; $p_H^+ = 5.96$ (voir «Ét. II», p. 29).

Par mesurage colorimétrique avec le p-nitrophénol comme indicateur et, comme liqueurs de comparaison, les mélanges de phosphate 0.7—1.0—1.25—1.5—2.0—2.5 sec («Ét. II», p. 71), la concentration en ions hydrogène de l'eau de mer examinée a été trouvée

égale à 1.45 sec.; $p_H^+ = 6.08$.

Par conséquent, la correction relative à l'erreur de sel sera égale à $5.96 \div 6.08 = \div 0.12$[1]).

Il est à remarquer que, ici comme toujours, le mesurage colorimétrique a porté sur l'eau salée ayant servi au mesurage électrométrique et qui a ensuite été transvasée du vase électrolytique dans des éprouvettes remplies d'air exempt d'acide carbonique et munies de bouchons en liège.

β) Rouge neutre; — mélanges de phosphates.

A 150 cc. d'eau salée débarrassée de son acide carbonique, on a ajouté $2^{cc}.6$ d'acide chlorhydrique normal au $^1/_5$ et $7^{cc}.5$ de borate («Ét. II», p. 35).

La marche du mesurage électrométrique était la même que celle que nous avons décrite en *α*.

Trouvée: $\pi = 0.7476$; $p_H^+ = 7.10$.

Par mesurage colorimétrique avec le rouge neutre comme indicateur et, comme liqueurs de comparaison, les mélanges de phosphates 5.0—5.5—6.0—6.5—7.0—7.5 sec., la concentration ionique de l'eau examinée a été trouvée

égale à 6.15 sec.; $p_H^+ = 7.01$.

Correction: $7.10 \div 7.01 = + 0.09$.

γ) *α*-naphtolphtaléine; mélanges de phosphates ou de borates.

A 150 cc. de l'eau salée débarrassée d'acide carbonique on a ajouté $2^{cc}.1$ d'acide chlorhydrique normal au $^1/_5 + 7^{cc}.55$ de borate.

La marche du mesurage électrométrique était la même que celle décrite en *α*.

Trouvée: $\pi = 0.7846$; $p_H^+ = 7.75$.

Par mesurage colorimétrique avec *α*-naphtolphtaléine comme indicateur et, comme liqueurs de comparaison, les mélanges de phosphates 8.75—9.0—9.2—9.4—9.6—9.75 sec. ou bien les mélanges de

[1]) Sans doute on n'est pas d'accord avec les règles de la mathématique, si pour faire la soustraction de deux puissances de 10, on fait simplement celle des exposants, et nous n'ignorons pas non plus qu'il n'est pas permissible de prendre la moyenne d'une série de puissances de 10 en prenant celle des exposants. Nous pensons toutefois que dans le cas qui nous occupe, un pareil procédé est non seulement justifiable, mais même le plus convenable au but (comp. «Ét. II», p. 6).

borates 5.3 — 5.4 — 5.5—5.6 — 5.8—6.0 de borate + HCl, la concentration ionique de l'eau examinée a été trouvée égale, respectivement, à

9.3 sec.; $p_H^+ = 7.00$ [1])

et à

5.55 de borate + HCl; $p_H^+ = 7.98$.

Correction (en employant les mélanges de phosphates):

$7.75 \div 7.90 = \div 0.15$.

Correction (en employant les mélanges de borates):

$7.75 \div 7.98 = \div 0.23$.

δ) Phénolphtaléine; — mélanges de borates.

A 150 cc. d'eau salée débarrassée d'acide carbonique on a ajouté $0^{cc}.5$ de lessive de soude normale au $^1/_5$ et $7^{cc}.5$ de borate.

La marche du mesurage électrométrique était la même que celle décrite en *α*.

Trouvée: $\pi = 0.8356$; $p_H^+ = 8.63$.

Par mesurage colorimétrique avec phénolphtaléine comme indicateur et, comme liqueurs de comparaison, les mélanges de borates 7.25 — 7.5 — 7.75 — 8.0 — 8.5 — 9.0 de borate + HCl, la concentration ionique de l'eau examinée a été trouvée égale à

7.8 de borate + HCl; $p_H^+ = 8.87$.

Correction: $8.63 \div 8.87 = \div 0.24$.

En suivant le même procédé que celui que nous venons d'exposer, nous avons examiné, en tout, 11 échantillons d'eau de mer contenant environ 35 pour mille de sel et 4 échantillons renfermant env. 20 pour mille de sel; toutefois, dans certains cas nous n'avons examiné que quelques-uns des indicateurs. Les moyennes [2]) des corrections ainsi trouvées étaient:

[1]) Voir S. P. L. Sørensen: Note supplémentaire au mémoire «Études enzymatiques II». Ces mêmes Comptes-rendus **8**, 396 (1909).

[2]) Dans quelques cas — et en particulier dans deux ou trois échantillons destinés au mesurage à l'aide du rouge neutre —, la force électromotrice accusait un accroissement continu, bien que très lent, au cours du mesurage électrométrique. Dans ces cas on comptait avec la dernière des mesures électrométriques effectuées. Dans le calcul ci-dessus de la correction moyenne, on n'a pas mis en ligne de compte la correction calculée au moyen du résultat de ces mesurages; mais dans le tableau 6, ces essais se trouvent insérés parmi les autres, et l'on voit par ce tableau que dans aucun cas l'écart n'a été bien considérable.

Du reste, nous ferons seulement signaler qu'en examinant dans la table principale des courbes («Ét. II», p. 44) la marche de la courbe des citrates et de celle des borates, on s'apercevra tout de suite que ni les mélanges de citrates ni ceux de borates ne se prêtent guère à servir de tampons dans la région où le rouge neutre accuse son meilleur virage.

α) p-nitrophénol (5 à 8 gouttes[1])); mélanges de phosphates.

35 ‰ de sel: ÷ 0.12
20 ‰ » : ÷ 0.08.

β) Rouge neutre (10 gtt.); mélanges de phosphates.

35 ‰ de sel: + 0.10
20 ‰ » : + 0.05.

γ) *α*-naphtolphtaléine (8 gouttes); mélanges de phosphates.

35 ‰ de sel: ÷ 0.16
20 ‰ » : ÷ 0.11.

δ) *α*-naphtolphtaléine (8 gtt.); mélanges de borates.

35 ‰ de sel: ÷ 0.22
20 ‰ » : ÷ 0.17.

ε) Phénolphtaléine (10—15 gouttes); mélanges de borates.

35 ‰ de sel: ÷ 0.21
20 ‰ » : ÷ 0.16.

Au moyen de ces corrections, on a calculé les tableaux 1 à 5, en suivant le procédé indiqué dans l'introduction au présent mémoire (voir p. 13).

L'utilisation des valeurs des exposants des ions hydrogène des liqueurs de comparaison, valeurs qui corrigées de l'erreur de sel des indicateurs se trouvent consignées aux tableaux 1 à 5, n'offre pas de difficulté; d'ailleurs, nous en avons déjà parlé dans l'introduction (p. 14). Nous ferons seulement remarquer ici, que l'ensemble des mesures sur lesquelles sont basés les tableaux de correction, se trouve résumé dans le tableau 6, qui sera compréhensible sans autre explication. En comparant entre elles les valeurs de p_H^+ indiquées dans la cinquième et la sixième colonne, on verra qu'il y a un parfait accord entre les mesures électrométriques et les colorimétriques (pour ces dernières, on a naturellement inscrit les valeurs de l'exposant corrigées de l'erreur de sel).

[1]) Pour ce qui concerne la concentration et la préparation des liqueurs indicatrices, nous renvoyons les lecteurs à «Ét. II», p. 107 et p. 113; voir aussi ces mêmes Comptes-rendus **9**, 15 (1910).

Tableau 1. *Mélanges de phosphates; p-nitrophénol.*

Composition du mélange de phosphates	Exposant des ions hydrogène, p_H^+, du mélange phosphatique		
	non corrigé	corrigé en vue de l'erreur de sel de l'indicateur	
		35 ‰ de sel (Corr. = ÷ 0.12)	20 ‰ de sel (Corr. = ÷ 0.08)
0cc.1 de sec. + 9cc.9 de prim.	4.94	4.82	4.86
0cc.2 » » + 9cc.8 » »	5.20	5.08	5.12
0cc.3 » » + 9cc.7 » »	5.36	5.24	5.28
0cc.4 » » + 9cc.6 » »	5.48	5.36	5.40
0cc.5 » » + 9cc.5 » »	5.59	5.47	5.51
0cc.7 » » + 9cc.3 » »	5.75	5.63	5.67
1cc.0 » » + 9cc.0 » »	5.91	5.79	5.83
1cc.25 » » + 8cc.75 » »	6.01	5.89	5.93
1cc.5 » » + 8cc.5 » »	6.10	5.98	6.02
2cc.0 » » + 8cc.0 » »	6.24	6.12	6.16
2cc.5 » » + 7cc.5 » »	6.37	6.25	6.29
3cc.0 » » + 7cc.0 » »	6.47	6.35	6.39
3cc.5 » » + 6cc.5 » »	6.57	6.45	6.49
4cc.0 » » + 6cc.0 » »	6.65	6.53	6.57
4cc.5 » » + 5cc.5 » »	6.73	6.61	6.65
5cc.0 » » + 5cc.0 » »	6.81	6.69	6.73
5cc.5 » » + 4cc.5 » »	6.90	6.78	6.82
6cc.0 » » + 4cc.0 » »	6.98	6.86	6.90
6cc.5 » » + 3cc.5 » »	7.07	6.95	6.99

Tableau 2. *Mélanges de phosphates; rouge neutre.*

Composition du mélange de phosphates	Exposant des ions hydrogène, p_H^+, du mélange phosphatique		
	non corrigé	corrigé en vue de l'erreur de sel de l'indicateur	
		35 ‰ de sel (Corr. = + 0.10)	20 ‰ de sel (Corr. = + 0.05)
3cc.5 de sec. + 6cc.5 de prim.	6.57	6.67	6.62
4cc.0 » » + 6cc.0 » »	6.65	6.75	6.70
4cc.5 » » + 5cc.5 » »	6.73	6.83	6.78
5cc.0 » » + 5cc.0 » »	6.81	6.91	6.86
5cc.5 » » + 4cc.5 » »	6.90	7.00	6.95
6cc.0 » » + 4cc.0 » »	6.98	7.08	7.03
6cc.5 » » + 3cc.5 » »	7.07	7.17	7.12
7cc.0 » » + 3cc.0 » »	7.17	7.27	7.22
7cc.5 » » + 2cc.5 » »	7.26	7.36	7.31
7cc.75 » » + 2cc.25 » »	7.32	7.42	7.37
8cc.0 » » + 2cc.0 » »	7.38	7.48	7.43
8cc.25 » » + 1cc.75 » »	7.45	7.55	7.50
8cc.5 » » + 1cc.5 » »	7.53	7.63	7.58
8cc.75 » » + 1cc.25 » »	7.62	7.72	7.67
9cc.0 » » + 1cc.0 » »	7.73	7.83	7.78

Tableau 3. *Mélanges de phosphates; α-naphtolphtaléine.*

Composition du mélange de phosphates	Exposant des ions hydrogène, p_H^+, du mélange phosphatique		
	non corrigé	corrigé en vue de l'erreur de sel de l'indicateur	
		35 ‰ de sel (Corr. = ÷ 0.16)	20 ‰ de sel (Corr. = ÷ 0.11)
7cc.5 de sec. + 2cc.5 de prim.	7.26	7.10	7.15
7cc.75 » » + 2cc.25 » »	7.32	7.16	7.21
8cc.0 » » + 2cc.0 » »	7.38	7.22	7.27
8cc.25 » » + 1cc.75 » »	7.45	7.29	7.34
8cc.5 » » + 1cc.5 » »	7.53	7.37	7.42
8cc.75 » » + 1cc.25 » »	7.62	7.46	7.51
9cc.0 » » + 1cc.0 » »	7.73	7.57	7.62
9cc.2 » » + 0cc.8 » »	7.84	7.68	7.73
9cc.4 » » + 0cc.6 » »	7.97	7.81	7.86
9cc.6 » » + 0cc.4 » »	8.14	7.98	8.03
9cc.75 » » + 0cc.25 » »	8.34	8.18	8.23

Tableau 4. *Mélanges de borates; α-naphtolphtaléine.*

Composition du mélange de borates	Exposant des ions hydrogène, p_H^+, du mélange boratique		
	non corrigé	corrigé en vue de l'erreur de sel de l'indicateur	
		35 ‰ de sel (Corr. = ÷ 0.22)	20 ‰ de sel (Corr. = ÷ 0.17)
5cc.25 de borate + 4cc.75 de HCl. . .	7.62	7.40	7.45
5cc.3 » » + 4cc.7 » » . . .	7.71	7.49	7.54
5cc.4 » » + 4cc.6 » » . . .	7.84	7.62	7.67
5cc.5 » » + 4cc.5 » » . . .	7.94	7.72	7.77
5cc.6 » » + 4cc.4 » » . . .	8.03	7.81	7.86
5cc.8 » » + 4cc.2 » » . . .	8.17	7.95	8.00
6cc.0 » » + 4cc.0 » » . . .	8.29	8.07	8.12
6cc.25 » » + 3cc.75 » » . .	8.41	8.19	8.24
6cc.5 » » + 3cc.5 » » . . .	8.51	8.29	8.34
6cc.75 » » + 3cc.25 » » . . .	8.60	8.38	8.43
7cc.0 » » + 3cc.0 » » . . .	8.68	8.46	8.51

Tableau 5. *Mélanges de borates; phénolphtaléine.*

Composition du mélange de borates	Exposant des ions hydrogène, p_H^+, du mélange boratique		
	non corrigé	corrigé en vue de l'erreur de sel de l'indicateur	
		35 ‰ de sel (Corr. = ÷ 0.21)	20 ‰ de sel (Corr. = ÷ 0.16)
6cc.0 de borate + 4cc.0 de HCl	8.29	8.08	8.13
6cc.25 » » + 3cc.75 » »	8.41	8.20	8.25
6cc.5 » » + 3cc.5 » »	8.51	8.30	8.35
6cc.75 » » + 3cc.25 » »	8.60	8.39	8.44
7cc.0 » » + 3cc.0 » »	8.68	8.47	8.52
7cc.25 » » + 2cc.75 » »	8.74	8.53	8.58
7cc.5 » » + 2cc.5 » »	8.80	8.59	8.64
8cc.0 » » + 2cc.0 » »	8.91	8.70	8.75
8cc.5 » » + 1cc.5 » »	9.01	8.80	8.85
9cc.0 » » + 1cc.0 » »	9.09	8.88	8.93
9cc.5 » » + 0cc.5 » »	9.17	8.96	9.01
10cc.0 » »	9.24	9.03	9.08

Tableau 6.

N°	Les échantillons d'eau examinés avaient été prélevés		avaient une teneur en sel, en ‰	p_H^+ des échantillons d'eau privés d'acide carbonique et additionnés de tampons appropriés, trouvé		
	Longitude	Latitude		par mesurage électrométrique p_H^+	par mesurage colorimétrique p_H^+	Observations
39	10° 47′ E.	54° 44′ N.	20.32	5.84	5.83	1.0 sec.; nitrophénol
				7.02	7.03	6.0 » ; rouge neutre
				7.68	7.67	9.1 » ; naphtolphtaléine
				7.68	7.67	5.4 borate; »
				8.68	8.70	7.75 » ; phénolphtaléine
41	10° 59′ E.	54° 38′ N.	20.84	5.91	5.91	1.2 sec.; nitrophénol
				7.13	7.14	6.6 » ; rouge neutre
				7.75	7.76	9.25 » ; naphtolphtaléine
				7.75	7.77	5.5 borate; »
				8.69	8.68	7.7 » ; phénolphtaléine
42	11° 01′ E.	54° 37′ N.	20.57	5.86	5.87	1.1 sec.; nitrophénol
				7.62	7.65	9.05 » ; naphtolphtaléine
				7.62	7.61	5.35 borate; »
43	11° 02′ E.	54° 36′ N.	19.98	5.87	5.91	1.2 sec.; nitrophénol
				6.98	6.98	5.7 » ; rouge neutre
				7.64	7.62	9.0 » ; naphtolphtaléine
				7.64	7.67	5.4 borate; »
				8.68	8.67	7.65 » ; phénolphtaléine

Tableau 6 (suite).

N°	Les échantillons d'eau examinés			P_H^+ des échantillons d'eau privés d'acide carbonique et additionnés de tampons appropriés, trouvé		
	avaient été prélevés		avaient une teneur en sel, en ‰	par mesurage électrométrique p_H^+	par mesurage colorimétrique p_H^+	Observations
	Longitude	Latitude				
59	12° 32′ O.	62° 32′ N.	35.23	6.25	6.20	2.3 sec.; nitrophénol
				7.60	7.55	8.25 » ; rouge neutre
				7.60	7.62	9.1 » ; naphtolphtaléine
				7.60	7.62	5.4 borate; »
				8.66	8.66	7.8 » ; phénolphtaléine
76	0° 00′	59° 15′ N.	35.14	5.91	5.91	1.3 sec.; nitrophénol
				7.18	7.17	6.5 » ; rouge neutre
				7.79	7.81	9.4 » ; naphtolphtaléine
				7.79	7.81	5.6 borate; »
				8.65	8.66	7.8 » ; phénolphtaléine
78	11° 45′ O.	58° 50′ N.	35.37	5.94	5.98	1.5 sec.; nitrophénol
				7.12	7.14	6.35 » ; rouge neutre
				7.80	7.78	9.35 » ; naphtolphtaléine
				7.80	7.77	5.55 borate; »
				8.64	8.63	7.7 » ; phénolphtaléine
81	26° 30′ O.	54° 55′ N.	35.21	5.84	5.79	1.0 sec.; nitrophénol
				7.20	7.15	6.4 » ; rouge neutre
				7.79	7.81	9.4 » ; naphtolphtaléine
				7.79	7.81	5.6 borate; »
				8.66	8.63	7.7 » ; phénolphtaléine
86	44° 15′ O.	45° 30′ N.	35.90	6.33	6.33	2.9 sec.; nitrophénol
				7.13	7.17	6.5 » ; rouge neutre
				7.76	7.74	9.3 » ; naphtolphtaléine
				7.76	7.77	5.55 borate; »
				8.65	8.63	7.7 » ; phénolphtaléine
93	60° 01′ O.	42° 12′ N.	35.95	5.96	5.96	1.45 sec.; nitrophénol
				7.10	7.11	6.15 » ; rouge neutre
				7.75	7.74	9.3 » ; naphtolphtaléine
				7.75	7.77	5.55 borate; »
				8.63	8.66	7.8 » ; phénolphtaléine
96	66° 07′ O.	40° 57′ N.	33.12	5.89	5.89	1.25 sec.; nitrophénol
				7.13	7.12	6.2 » ; rouge neutre
				7.74	7.74	9.3 » ; naphtolphtaléine
				7.74	7.72	5.5 borate; »
				8.64	8.66	7.8 » ; phénolphtaléine
113 a	9° 45′ O.	39° 35′ N.	35.91	7.63	7.60	8.4 sec.; rouge neutre
				7.63	7.62	9.1 » ; naphtolphtaléine
				7.63	7.62	5.4 borate; »
				8.75	8.75	8.25 » ; phénolphtaléine
114 a	7° 55′ O.	44° 21′ N.	35.63	5.90	5.91	1.3 sec.; nitrophénol
				7.66	7.65	8.55 » ; rouge neutre
				7.66	7.68	9.2 » ; naphtolphtaléine
				7.66	7.67	5.45 borate; »
				8.64	8.63	7.7 » ; phénolphtaléine
117 a	5° 22′ O.	48° 06′ N.	35.35	5.84	5.89	1.25 sec.; nitrophénol
				7.45	7.44	8.7 » ; naptholphtaléine
				7.97	7.95	5.8 borate; »
				8.64	8.63	7.7 » ; phénolphtaléine
119 a	3° 35′ E.	52° 35′ N.	35.15	7.59	7.54	8.2 sec.; rouge neutre
				8.63	8.63	7.7 borate; phénolphtaléine

Deja dans notre introduction, nous avons signalé qu'il n'est guère possible de mesurer par le procédé électrométrique habituel un échantillon d'eau de mer naturelle, donc contenant de l'acide carbonique, parce qu'au cours du mesurage il s'échappe continuellement de l'acide carbonique, ce qui a pour effet que la concentration en ions hydrogène diminue en proportion. Afin de mettre en lumière cet état de choses, nous allons citer quelques essais faits dans ce sens.

α) Eau de mer n° 59 (35,23 ‰ de sel).

On a transvasé l'eau de la bouteille directement dans le vase électrolytique, et ensuite on y a fait passer le courant d'hydrogène à 9 heures 50 minutes.

A $10^h\,30^m$, on a trouvé $\pi = 0.7971$, $p_H^+ = 7.96$
11^h » » » $= 0.8080$, » $= 8.15$
12^h » » » $= 0.8176$, » $= 8.32$
1^h » » » $= 0.8234$, » $= 8.42$
2^h » » » $= 0.8276$, » $= 8.49$
3^h » » » $= 0.8313$, » $= 8.55$
7^h » » » $= 0.8388$, » $= 8.68$.

Par mesurage colorimétrique de l'eau salée du vase électrolytique, laquelle avait déjà fait l'objet du mesurage électrométrique, on a trouvé, en se servant de la phénolphtaléine comme indicateur et, comme liqueurs de comparaison, de mélanges de borates, que la concentration ionique de cette eau était égale à

7.9 borate + HCl; $p_H^+ = 8.68$ (tableau 5 p. 22).

β) Eau de mer n° 113 (35.91 ‰ de sel).

Le courant d'hydrogène a été ouvert à $10^h\,8^m$.

A $10^h\,30^m$ on a trouvé $\pi = 0.7876$, $p_H^+ = 7.80$
11^h » » » $= 0.8026$, » $= 8.06$
12^h » » » $= 0.8138$, » $= 8.25$
$1^h\,40^m$ » » $= 0.8216$, » $= 8.39$.

L'eau de mer soumise à ce mesurage fut mesurée colorimétriquement avec la phénolphtaléine comme indicateur et, comme liqueurs de comparaison, des mélanges de borates. La concentration ionique a été trouvée égale à

6.8 borate + HCl; $p_H^+ = 8.41$ (tableau 5 p. 22).

Pour terminer, nous allons exposer une série de mesurages colorimétriques que nous avons effectués sur nos échantillons d'eau salée directement enlevés aux bouteilles dans lesquelles ils avaient été conservés. Par ces mesurages, qui se trouvent résumés dans les tableaux 7 à 10, nous ne croyons pas avoir obtenu

Tableau 7. *Échantillons d'eau de mer; série I (p. 15).*

N°	Les échantillons d'eau examinés avaient été prélevés			avaient une teneur en sel, en ‰	Mesurage colorimetrique	
	Longitude	Latitude	Profondeur m		p_H^+	Observations
1	12° 28′ E.	56° 12′ N.	21	31.78	6.85	5.9 sec.; nitrophénol
					6.80	4.4 » ; rouge neutre
2	12° 27′ »	56° 13′ »	0	20.34	6.61	4.25 » ; nitrophénol
					6.57	3.25 » ; rouge neutre
3	12° 23′ »	56° 18′ »	23	33.45	7.78	8.9 » ; »
4	12° 21′ »	56° 20′ »	0	20.03	6.78	4.5 » ; »
7	11° 50′ »	57° 01′ »	0	25.08	7.04	6.0 » ; »
10	11° 41′ »	57° 20′ »	37	34.00	7.29	7.1 » ; »
14	10° 59′ »	57° 58′ »	env. 90	34.96	7.12	6.2 » ; »
18	10° 45′ »	57° 53′ »	0	31.35	7.16	6.5 » ; »
19	10° 44′ »	57° 10′ »	16	28.87	6.69	4.9 » ; nitrophénol
					6.67	3.6 » ; rouge neutre
20	10° 47′ »	57° 06′ »	0	28.06	6.81	4.5 » ; »
25	10° 58′ »	56° 28′ »	16	29.32	7.11	6.25 » ; »
28	10° 59′ »	56° 00′ »	0	25.39	7.12	6.4 » ; »
31	10° 52′ »	55° 39′ »	0	22.01	6.91	5.25 » ; »
34	11° 04′ »	55° 17′ »	0	22.16	7.12	6.5 » ; »
35	11° 00′ »	54° 59′ »	0	21.41	7.90	9.45 » ; naphtolphtaléine
					7.89	5.65 borate; »
37	10° 50′ »	54° 51′ »	0	20.39	7.03	6.0 sec.; rouge neutre
39	10° 47′ »	54° 44′ »	0	20.32	6.91	5.3 » ; »
40	10° 46′ »	54° 44′ »	0	21.04	7.37	7.75 » ; »
41	10° 59′ »	54° 38′ »	21	20.84	7.16	6.7 » ; »
42	11° 01′ »	54° 37′ »	0	20.57	7.65	9.05 » ; naphtolphtaléine
43	11° 02′ »	54° 36′ »	0	19.98	6.83	4.8 » ; rouge neutre

des renseignements sur la concentration ionique qu'avaient ces échantillons au moment où on les prélevait sur la mer. La raison pour laquelle nous donnons ces mesures, c'est qu'elles nous fournissent l'occasion de démontrer combien facilement la concentration ionique de l'eau subit des changements entre le moment de la prise et celui de l'examen, et combien il est, par conséquent, nécessaire d'entreprendre le mesurage à bord aussitôt que possible après la prise des échantillons.

Tableau 8. *Échantillons d'eau de mer, série II (p. 15).*

(Prélevés à la surface).

N°	Les échantillons d'eau examinés avaient été prélevés — Longitude	Latitude	avaient une teneur en sel, en ‰	Mesurage colorimétrique P_H^+	Observations
51	3° 44′ O.	59° 49′ N.	35.35	7.78	9.35 sec.; naphtolphtaléine
				7.81	5.6 borate; »
53	5° 07′ »	60° 54′ »	35.23	8.01	5.9 » ; »
54	6° 22′ »	61° 51′ »	35.10	7.46	7.9 sec.; rouge neutre
				7.42	8.65 » ; naphtolphtaléine
55	8° 37′ »	62° 10′ »	35.26	6.96	5.25 » ; rouge neutre
57	10° 37′ »	62° 22′ »	35.25	6.65	4.75 » ; nitrophénol
				6.69	3.6 » ; rouge neutre
58	11° 31′ »	62° 28′ »	35.23	6.95	5.2 » ; »
59	12° 32′ »	62° 32′ »	35.23	7.42	8.65 » ; naphtolphtaléine
60	13° 43′ »	62° 40′ »	35.25	6.81	5.7 » ; nitrophénol
				6.83	4.5 » ; rouge neutre
61	14° 52′ »	62° 47′ »	35.23	7.17	6.5 » ; »
63	18° 50′ »	62° 48′ »	35.21	7.17	6.5 » ; »
65	16° 12′ »	62° 04′ »	35.25	7.13	6.3 » ; »
66	14° 21′ »	61° 36′ »	35.25	7.12	6.2 » ; »
67	11° 11′ »	60° 48′ »	35.25	7.63	8.5 » ; »
				7.60	9.05 » ; naphtolphtaléine
68	10° 03′ »	60° 28′ »	35.28	6.74	5.25 » ; nitrophénol
				6.69	3.6 » ; rouge neutre
69	8° 56′ »	60° 10′ »	35.25	6.83	4.5 » ; »
70	7° 56′ »	59° 53′ »	35.32	7.67	8.6 » ; »
				7.62	9.1 » ; naphtolphtaléine
71	6° 48′ »	59° 36′ »	35.32	7.37	8.5 » ; «
72	6° 44′ »	59° 20′ »	35.35	6.82	5.75 » ; nitrophénol
				6.78	4.2 » ; rouge neutre
73	4° 53′ »	59° 07′ »	35.10	6.91	5.0 » ; »

Comme, en outre, beaucoup de ces échantillons ont accusé une concentration en ions hydrogène susceptible d'être mesurée au moyen de plusieurs indicateurs, nous avons pour un certain nombre de nos échantillons opéré des mesurages avec deux indicateurs et, par ce moyen, nous avons obtenu une mesure du

degré de précision avec lequel on pourra compter lors de l'application pratique de cette méthode. On pourra voir par les tableaux 7 à 10 que la concordance entre les mesures effectuées avec deux indicateurs différents est même particulièrement bonne. L'écart est, tout au plus, de 0.07 dans la valeur de l'exposant des ions hydrogène, et ordinairement il est de beaucoup moindre, malgré que toutes ces mesures se rapportent aux régions limitrophes, où les zones de virage des divers indicateurs se couvrent l'une l'autre et où, en conséquence, le virage n'est pas aussi net qu'il l'est au centre[1]).

En examinant de plus près les chiffres réunis dans les tableaux ci-dessus, on remarque que les échantillons d'eau de la série I sont, en général, les plus acides, alors que ceux de la série II, et surtout ceux de la série III, sont, pour la plupart, un peu plus alcalins, et que les eaux de la série IV sont généralement de beaucoup plus alcalines que celles des trois premières séries. Ces différences de concentration ionique ne proviennent certainement pas de différences analogues ayant déjà existé au moment de la prise des échantillons; elles proviennent, selon toute probabilité, du fait que ceux-ci avaient été conservés dans des bouteilles. Nous avons déjà mentionné (p. 15) que les trois premières séries d'échantillons nous avaient été envoyées dans des bouteilles vertes ordinaires, tandis que ceux de la série IV se trouvaient dans des bouteilles à eau gazeuse de la contenance d'un demi-litre, ce qui rend probable que, pendant la conservation, le verre a abandonné au contenu une proportion relativement forte d'ingrédients alcalins.

A ce propos, il est intéressant de noter que, parmi ces bouteilles à eau gazeuse faites de verre bleuâtre, il y en avait quatre dont le verre était à peu près incolore. La différence de cou-

[1]) En examinant les tableaux 7 à 10, on s'apercevra que dans toutes les mesures effectuées et avec le rouge neutre et avec la naphtolphtaléine, la valeur de p_H^+ trouvée au moyen de cet indicateur-là est la plus élevée. Ainsi qu'il a été dit plus haut, la différence est très faible; mais comme dans toutes les expériences elle est du même signe, nous sommes portés à croire qu'elle n'est pas due exclusivement à des erreurs expérimentales accidentelles, mais qu'elle est imputable à une source d'erreur méthodique. Il paraît, en effet, assez probable que cette erreur, qui en tout cas est d'une importance tout à fait secondaire, doit avoir sa source dans le fait que la grandeur de l'erreur de sel est à peine constante, mais plutôt légèrement variable selon la concentration en ions hydrogène (comp. p. 13).

Tableau 9. *Échantillons d'eau de mer, série III (p. 16).*

(Prélevés à la surface).

N°	Les échantillons d'eau examinés avaient été prélevés — Longitude	Latitude	avaient une teneur en sel, en ‰	Mesurage colorimétrique — P_H^+	Observations
74	5° 20′ E.	58° 15′ N.	33.57	7.00	5.5 sec. ; rouge neutre
75	2° 25′ »	58° 48′ »	35.16	7.55	8.25 » ; »
76	0° 00′	59° 15′ »	35.14	7.81	9.4 » ; naphtolphtaléine
78	11° 45′ O.	58° 50′ »	35.37	7.08	6.0 » ; rouge neutre
79	17° 00′ »	57° 47′ »	35.30	7.48	8.0 » ; »
				7.46	8.75 » ; naphtolphtaléine
81	26° 30′ »	54° 55′ »	35.21	7.08	6.0 » ; rouge neutre
82	31° 00′ »	52° 50′ »	35.07	7.49	8.05 » ; »
				7.46	8.75 » ; naphtolphtaléine
83	34° 20′ »	51° 01′ »	35.46	7.17	6.5 » ; rouge neutre
85	41° 00′ »	47° 00′ »	35.66	6.84	5.9 » ; nitrophénol
				6.85	4.6 » ; rouge neutre
86	44° 15′ »	45° 30′ »	35.90	7.74	9.3 » ; naphtolphtaléine
87	47° 40′ »	44° 30′ »	33.30	7.30	7.2 » ; rouge neutre
				7.26	8.15 » ; naphtolphtaléine
89	51° 59′ »	43° 45′ »	33.13	7.56	8.3 » ; rouge neutre
				7.55	8.95 » ; naphtolphtaléine
91	55° 54′ »	43° 00′ »	32.84	6.96	5.35 » ; rouge neutre
93	60° 01′ »	42° 12′ »	35.95	7.68	9.2 » ; naphtolphtaléine
94	62° 08′ »	41° 52′ »	33.80	6.75	5.3 » ; nitrophénol
				6.78	4.2 » ; rouge neutre
95	64° 00′ »	41° 20′ »	33.96	7.81	9.4 » ; naphtolphtaléine
96	66° 07′ »	40° 57′ »	33.12	7.34	7.4 » ; rouge neutre

leur des bouteilles était fort accusée, et il est manifeste que ces quatre bouteilles étaient faites d'une sorte de verre particulièrement susceptible d'abandonner des ingrédients alcalins; car les échantillons qui y étaient renfermés (N°s 106 b, 110 a, 118 a et 120 a du tableau 10) étaient tous d'une alcalinité très marquée. L'influence exercée par l'espèce de verre se manifeste avec une netteté toute particulière quand nous comparons entre eux les n°s 106 a et 106 b, ou bien les n°s 110 a et 110 b, puisque a et b

Tableau 10. *Échantillons d'eau de mer, série IV (p. 16).*

(Prélevés à la surface).

Les échantillons d'eau examinés				Mesurage colorimétrique	
N°	avaient été prélevés		avaient une teneur en sel, en ‰	p_H^+	Observations
	Longitude	Latitude			
101 a	2° 30′ E.	36° 54′ N.	36.69	7.81	9.4 sec.; naphtolphtaléine
101 b	»	»	»	7.98	9.6 » ; »
102 a	1° 17′ »	37° 02′ »	37.30	7.81	9.4 » ; »
102 b	»	»	»	7.85	9.45 » ; »
103 a	0° 37′ O.	36° 27′ »	36.91	7.93	9.55 » ; »
				7.95	5.8 borate; »
103 b	»	»	»	7.93	9.55 sec.; »
				7.95	5.8 borate; »
104 a	1° 02′ »	35° 55′ »	36.66	7.69	8.65 sec.; rouge neutre
				7.62	9.1 » ; naphtolphtaléine
				7.62	5.4 borate; »
104 b	»	»	»	7.89	9.5 sec.; »
				7.88	5.7 borate; »
105 a	1° 54′ »	36° 30′ »	37.60	7.73	8.75 sec.; rouge neutre
				7.67	9.18 » ; naphtolphtaléine
				7.69	5.48 borate; »
105 b	»	»	»	7.71	8.7 sec.; rouge neutre
				7.67	9.18 » ; naphtolphtaléine
106 a	4° 24′ »	36° 36′ »	36.86	7.89	9.5 » ; »
106 b	»	»	»	8.36	6.7 borate; »
(bouteille blanche)				8.32	6.55 » ; phénolphtaléine
107 a	4° 24′ »	36° 02′ »	36.45	7.63	8.5 sec.; rouge neutre
				7.62	9.1 » ; naphtolphtaléine
107 b	»	»	»	7.89	9.5 » ; »
108 a	5° 15′ »	36° 02′ »	36.60	7.60	8.4 » ; rouge neutre
				7.55	8.95 » ; naphtolphtaléine
108 b	»	»	»	7.65	8.55 » ; rouge neutre
				7.63	9.12 » ; naphtolphtaléine
110 a	6° 52′ »	36° 16′ »	36.43	8.64	7.75 borate; phenolphtaléine
(bouteille blanche)					
110 b	»	»	»	7.67	9.18 sec.; naphtolphtaléine
				7.67	5.45 borate; »
112 a	9° 44′ »	36° 45′ »	36.30	8.29	6.5 » ; »
113 a	9° 45′ »	39° 35′ »	35.91	7.42	8.65 sec.; »
114 a	7° 55′ »	44° 21′ »	35.63	7.60	8.4 » ; rouge neutre
115 a	7° 03′ »	45° 37′ »	35.61	7.42	7.75 » ; »
116 a	5° 48′ »	47° 01′ »	35.60	7.48	8 » ; »
117 a	5° 22′ »	48° 06′ »	35.35	7.65	9.15 » ; naphtolphtaléine
118 a	4° 05′ »	49° 00′ »	35.43	8.38	6.75 borate; »
(bouteille blanche)				8.37	6.7 » ; phénolphtaléine
119 a	3° 35′ E.	52° 35′ »	35.15	7.71	9.25 sec.; naphtolphtaléine
120 a	6° 00′ »	53° 45′ »	33.21	8.25	6.4 borate;
(bouteille blanche)				8.26	6.4 » ; phénolphtaléine

avaient fait partie d'un même échantillon; la différence ne provient uniquement que de la conservation en bouteilles.

Déjà dans l'introduction (p. 9) nous avons signalé une autre source d'erreur qui peut avoir son importance dans une conservation prolongée d'une eau de mer, à savoir le fait que, au contact de l'air d'une bouteille non entièrement remplie, elle abandonne de l'acide carbonique, ou bien, qu'elle en absorbe. Aussi, une fois une bouteille entamée, le reste de l'eau ne tardera pas à changer de concentration ionique par suite de la perte d'acide carbonique. Afin de donner une idée de la grandeur des changements dont il est question, nous avons, dans le tableau 11, rassemblé quelques mesures effectuées immédiatement après l'ouverture de la bouteille et répétées au bout d'un à deux mois, période pendant laquelle la bouteille avait été laissée en repos à moitié pleine et hermétiquement fermée; dans tous les cas on a pu constater un changement très important de la concentration ionique.

Si l'on compare entre elles toutes les mesures données dans les tableaux 7 à 10, on verra que les exposants des ions hydrogène sont situés entre les extrêmes 6.6 (N° 2, tableau 7) et 8,6 (N° 110 a, tableau 10), en d'autres termes, dans le premier cas ($10^{-6,6}$) la concentration en ions hydrogène est 100 fois plus grande que dans le second ($10^{-8,6}$). Il est possible cependant, ou même probable, qu'en réalité la concentration ionique de l'eau de mer ne soit pas sujette à des variations aussi fortes et que la raison de la réaction franchement alcaline que présente surtout la série IV, doive être cherchée exclusivement dans l'alcalinité du verre. S'il en était ainsi, il y a possibilité que dans les mesurages colorimétriques de la concentration ionique de l'eau de mer, on n'ait pas besoin des mélanges de borates et qu'on puisse se contenter des mélanges de phosphates, au moyen desquels on peut mesurer, suivant le tableau 3, l'exposant des ions hydrogène jusqu'à 8 et même légèrement plus haut. Cependant on ne peut rien en dire encore — il faut se rappeler que, en ce qui concerne cette question, rien jusqu'ici n'a encore été résolu. — Néanmoins, en vue de toutes éventualités, nous avons cru devoir faire porter nos recherches sur les mélanges de borates aussi.

D'un autre côté, on peut se demander si les mélanges de phosphates et l'indicateur p-nitrophénol sont à même d'atteindre

suffisamment le côté acide pour permettre de mesurer même l'eau salée la plus riche en acide carbonique. Nous sommes disposés à croire qu'il faudra répondre affirmativement à cette question; mais une réponse définitive ne pourra évidemment être donnée qu'à l'aide de mesurages effectués à bord.

La même remarque s'applique à certaines conditions dans lesquelles il faudra se placer lors de l'application de la méthode à bord. Pour ce qui est de la température par exemple, il est à noter que tous nos essais ont été faits à 18° et, par conséquent, pour pouvoir réaliser un mesurage bien précis, il est indispensable avant celui-ci de chauffer l'eau à cette température aussi rapidement que possible et sans qu'il y ait pu avoir perte d'acide carbonique.

Nous espérons revenir à cette question quand notre méthode aura été expérimentée en pratique. Il y aurait peut-être lieu d'évaluer l'erreur de sel pour des eaux de mer ayant une teneur en sel inférieure à 20 pour mille; mais jusqu'ici nous n'avons pas eu de tels échantillons à notre disposition[1]).

[1]) Dans le but d'élucider la question relative à la grandeur de l'erreur à laquelle donnerait lieu une très faible teneur en sel, nous avons fait un seul essai en employant l'eau salée n° 39 (20.32 ‰ de sel) étendue avec 3 fois son volume d'eau distillée, de manière à réduire la teneur en sel à 5 ‰ environ. Après avoir débarrassé cette eau étendue de son acide carbonique, comme à l'ordinaire, on a fixé la concentration ionique à l'aide des tampons habituels.

Les mesurages ont alors donné les résultats que voici:

Mesure électrométrique	Mesure colorimétrique			Correction
p_H^+	p_H^+	Liqueurs de comparaison	Indicateurs	
6.15	6.17	Mél. de phosph.	Nitrophénol	÷ 0.02
7.16	7.12	»	Rouge neutre	÷ 0.04
7.84	7.76	»	Naphtolphtaléine	+ 0.08
7.84	7.82	Mél. de borates	»	+ 0.02
8.80	8.82	»	Phénolphtaléine	÷ 0.02

On peut remarquer que dans les quatre mesures l'erreur de sel ne sort pas du tout de la limite des erreurs expérimentales; ce n'est que dans un seul cas, à savoir dans le mesurage fait au moyen des mélanges de phosphates et de la naphtolphtaléine, qu'il faut indubitablement compter avec une correction. Celle-ci est positive, alors que la correction correspondante de l'eau à 20 ‰ est négative. Ceci se comprend cependant facilement, si l'on se rappelle que dans le cas des mélanges de phosphates la correction relative à la naphtolphtaléine n'est pas la même que pour les mélanges de borates. Autant pour l'eau à 35 ‰ que pour celle à 20 ‰, la différence est

Tableau 11.

N° de l'échantillon examiné	Mesurage colorimétrique			
	immédiatement après l'ouverture de la bouteille		au bout de 1 ou 2 mois, pendant lesquels la bouteille à moitié remplie était restée fermée	
	p_H^+	Observations	p_H^+	Observations
39	6.91	5.3 sec.; rouge neutre	7.62	8.6 sec.; rouge neutre
			7.58	8.9 » ; naphtolphtaléine
41	7.16	6.7 » ;	7.94	9.5 » ; »
			7.93	5.7 borate; »
42	7.65	9.05 » ; naphtolphtaléine	7.94	9.5 sec.; »
			7.90	5.65 borate; »

Il ne nous reste plus qu'à mentionner encore une circonstance qui a une certaine importance pour l'application pratique de notre procédé à bord. Supposons qu'il s'agisse d'exécuter dans le courant d'une journée autant de mesurages que possible. Le plus commode alors sera de commencer par mesurer et colorer toutes les liqueurs de comparaison: le mesurage de chaque échantillon ne prendra ainsi que quelques minutes. Toutefois, une condition sans laquelle ce procédé ne pourra pas être mis en pratique, c'est que l'intensité et la nuance de coloration des liqueurs de comparaison ne subissent pas de changement pendant l'espace de temps que durent les mesurages. Les essais que nous avons effectués dans le but d'élucider cette question, nous ont permis de constater que les liqueurs colorées au nitrophénol, au rouge neutre et à la phénolphtaléine, se maintenaient ordinairement inaltérées pendant toute la journée, et que, d'autre part, celles préparées au moyen de la naphtolphtaléine étaient parfois susceptibles de diminuer un peu d'intensité; toutefois les modifications observées étaient à peine sensibles.

Il va sans dire qu'au cours des mesurages il ne faut jamais perdre de vue la source d'erreur que nous venons de signaler, et que par coloration d'un ou plusieurs mélanges appropriés, il faut vérifier de temps à autre si l'intensité et la teinte des di-

de 0.06 (voir p. 19), et l'on peut voir qu'ici la différence est de la même grandeur; en conséquence, le zéro de la correction en ce qui concerne la naphtolphtaléine et les mélanges de phosphates, est situé à une teneur en sel supérieure à 5 ‰.

verses liqueurs se sont bien maintenues inaltérées. Dans les cas où un changement de couleur bien marqué se serait produit, il faudra colorer de nouvelles liqueurs de comparaison, et, s'il s'agit de mesures particulièrement précises, on devra avoir soin, de n'employer, autant que possible, que des liqueurs récemment colorées.

Lorsque les liqueurs doivent servir pendant plusieurs heures, il est recommandable — surtout pour ce qui concerne les mélanges les plus alcalins — de bien fermer les éprouvettes au moyen de bouchons en liège, afin d'empêcher l'acide carbonique de l'air d'y pénétrer.

Note additionnelle

Dans un des derniers fascicules de la Biochemische Zeitschrift[1]) MM. L. Michaelis et P. Rona ont publié un mémoire intitulé: «Der Einfluss der Neutralsalze auf die Indicatoren». Le résultat principal de leur travail est le suivant[2]): «Methylviolett wird nach Salzzusatz scheinbar nach der sauren, Kongorot nach der alkalischen, Tropäolin, Methylorange, Alizarinrot nach der sauren, Rosolsäure, Trinitrobenzol nach der alkalischen, Phenolphtalein nach der sauren Seite verschoben».

Les auteurs ne font pas remarquer qu'en plusieurs points les indications citées sont en contradiction avec les résultats obtenus dans notre laboratoire[3]): — c'est ainsi que nous avons trouvé que, par exemple, le p-nitrophénol et la phénolphtaléine indiquent la réaction d'une solution saline comme trop alcaline; c'est pourquoi nous croyons nécessaire de mentionner plus en détail cet état de choses.

Michaelis et Rona partent de ce principe que la concentration en ions hydrogène d'un mélange de phosphates ne s'altère pas par l'addition d'un sel neutre, par exemple, le chlorure de potassium. Or, ayant trouvé qu'après addition d'une forte dose de chlorure potassique, un mélange de phosphates convenable donne avec l'indicateur p-nitrophénol une coloration plus pâle que celle produite, dans des conditions d'ailleurs égales, par un mélange de phosphates exempt de chlorure potassique,

[1]) Bioch. Zeitschr. **23**, 61 (1909).

[2]) A l'endroit cité, p. 65.

[3]) S. P. L. Sørensen: Ces mêmes Comptes-rendus **8**, 75 (1909). Bioch. Zeitschr. **21**, 208 (1909).

ils en ont conclu que l'indicateur p-nitrophénol est influencé par le sel de façon à indiquer comme trop acide la réaction de la solution.

A titre de comparaison, nous allons citer un essai analogue effectué dans notre laboratoire et publié dans le mémoire précité de S. P. L. Sørensen.

Nous nous sommes servis du mélange de phosphates «6.5 sec. + 3.5 prim.», solution dont l'exposant des ions hydrogène est de $p_H^+ = 7.06$. Après addition de chlorure sodique pur en quantité telle que sous ce rapport la solution devînt 0.5 normale, on a mesuré la concentration ionique tant électrométriquement (trouvé $p_H^+ = 6.66$) que par colorimétrie, avec le p-nitrophénol comme indicateur (trouvé $p_H^+ = 6.80$). Si, à l'exemple de Michaelis et Rona, on admet que la concentration en ions hydrogène du mélange phosphatique ne change pas par l'addition de sel, de sorte que pour tout mélange phosphatique, même contenant du sel marin, il faut compter avec $p_H^+ = 7.06$, il est évident que le mesurage colorimétrique ($p_H^+ = 6.80$) montrera une acidité trop élevée, donc un p_H^+ trop peu élevé; mais si avec nous on compte avec la concentration en ions hydrogène trouvée au moyen du mesurage électrométrique du mélange phosphatique renfermant du sel marin ($p_H^+ = 6.66$), le mesurage colorimétrique accusera une acidité trop peu élevée et, par conséquent, un p_H^+ trop élevé (= 6.80).

On voit donc que la différence entre les résultats trouvés par Michaelis et Rona, d'un côté, et de l'autre, ceux auxquels nous sommes arrivés, provient de la manière différente dont nous avons déterminé la concentration ionique de la solution saline. En effet, Michaelis et Rona ne se sont pas servis du mesurage électrométrique ainsi que nous l'avons fait, et la raison en est (d'après une communication particulière que M. le Professeur Michaelis nous a obligeamment envoyée) qu'ils n'admettaient pas qu'on pût toujours et dans tous les cas se fier au procédé électrométrique qui, selon eux, pourrait, lui aussi, donner lieu à une erreur de sel.

Nous avouerons que cette éventualité-ci n'est point exclue, surtout lorsqu'il est question de concentrations salines très importantes[1]); mais nous ne connaissons pas pour le moment d'autre

[1]) Comparez, par exemple, S. P. L. Sørensen, ces mêmes Comptes-rendus **8**, 76, Note (1909), Biochem. Zeitschr. **21**, 210, Note (1909).

procédé que le mesurage électrométrique, lorsqu'il s'agit d'établir la concentration en ions hydrogène dans des solutions de mélanges salins tels que ceux dont nous nous occupons ici. En tout cas, le procédé adopté par Michaelis et Rona ne nous paraît pas recommandable, puisqu'il donne toujours lieu à une erreur plus ou moins forte.

Pour nous servir d'un exemple très simple et facile à comprendre, supposons que nous ayons à nous occuper d'une solution aqueuse de phosphate secondaire sodique pur; c'est un fait admis et reconnu que la teneur en ions hydroxyle d'une telle solution — et conséquemment sa teneur en ions hydrogène — provient de l'hydrolyse du phosphate secondaire, par laquelle celui-ci se change en sel primaire et hydroxyde de sodium, qui à son tour se dissocie en ions sodium et ions hydroxyle. Une addition de chlorure sodique à cette solution aura tout d'abord pour effet de réprimer la dissociation de l'hydroxyde sodique, de sorte que la teneur en ions hydroxyle en sera diminuée et que, partant, celle en ions hydrogène s'accroîtra.

Lorsqu'il s'agit de mélanges de phosphates, on verra se produire des changements tout à fait analogues, qui toutefois dans le cas de solutions de mélanges tant soit peut complexes, échapperont à tout calcul exact.

C'est pourquoi, lorsqu'on a à déterminer les erreurs de sel des indicateurs, nous ne voyons, pour le moment du moins, pas d'autre méthode que la nôtre, parce que lors de la détermination de la grandeur de l'erreur de sel, on ne peut pas négliger le changement de concentration ionique provoqué par l'addition de sel, changement qui, surtout dans le cas de petites proportions de sel, peut souvent atteindre la même grandeur que l'erreur de sel de l'indicateur.

Un exemple bien propre à éclaircir cette question, nous est donné par quelques essais que Michaelis et Rona ont faits avec la phénolphtaléine. Ces essais ont démontré qu'un mélange de phosphates qui avec la phénolphtaléine donnait une teinte rosé bien distincte, devenait presque incolore lorsqu'on y ajoutait une faible dose de chlorure de potassium, tandis qu'une nouvelle addition de ce chlorure reproduisait la coloration rosée, coloration qu'une addition abondante de la même substance fit passer au rouge vif. D'après Michaelis et Rona, la phénolphtaléine, dans le cas d'une faible addition de sel, accusera donc

un deplacement de la concentration ionique vers le côté acide, tandis qu'avec une forte addition de sel le deplacement se tournera vers le côté alcalin.

Ces essais s'expliqueront beaucoup plus facilement, si l'on se rappelle que l'addition de sel, outre son action sur l'indicateur, amène en même temps une modification de la concentration ionique. Dans les essais considerés, la solution phosphatique devient plus acide par suite de l'addition de sel, alors que la phénolphtaleine, à cause de l'erreur de sel, indiquera la réaction de la solution comme trop alcaline. Ces deux facteurs diamétralement opposés ne se neutralisent pas l'un l'autre: dans le cas d'une faible addition de sel c'est le premier facteur qui prédomine, tandis que lors d'une abondante addition c'est le second qui l'emporte.

Même pour ce qui concerne les indicateurs dont l'erreur de sel va dans le même sens que la modification provoquée par l'addition de sel dans la concentration ionique, il importe de bien se rendre compte de l'influence des deux facteurs en question, et pour en démontrer l'importance, nous pouvons citer l'essai exposé precedemment, dans lequel, après addition de sel, le mélange de phosphates «6.5 sec. + 3.5 prim.» ($p_H^+ = 7.06$) donnait par mesurage électrométrique $p_H^+ = 6.66$.

La solution saline a également été mesurée par voie colorimétrique avec le rouge neutre comme indicateur, et le résultat a été $p_H^+ = 6.57$. On voit donc que le rouge neutre indique la réaction de la solution saline comme trop acide, et ce, soit qu'on compte à 7.06 ou à 6.66 l'exposant des ions hydrogène de la solution; mais dans ce dernier cas l'erreur de sel est bien minime, alors que dans le premier cas sa grandeur est telle que, si cette manière de voir etait exacte, on devrait donner raison à Michaelis et Rona et admettre avec eux que le rouge neutre ne peut guère être employé dans le mesurage colorimétrique de solutions riches en sels.

En terminant, il ne nous reste plus qu'à signaler que Michaelis et Rona, eux aussi, déterminent par voie électrométrique la concentration en ions hydrogène des solutions phosphatiques exemptes de sels neutres, probablement parce qu'ils partent de ce principe que les phosphates présents ne donnent pas lieu à aucune erreur de mesurage. Pourquoi alors ne pas adop-

ter la même manière de voir vis-à-vis des autres solutions salines tant soit peu faibles?

Comme les résultats dont il est question dans la présente note, pourront au premier abord paraître contradictoires et, par conséquent, donner lieu à une certaine confusion, il serait à désirer que lors de la détermination de la concentration en ions hydrogène de pareilles solutions très légèrement acides, neutres, ou très légèrement alcalines, on partît à l'avenir de principes identiques, ou qu'en tout cas on eût soin de préciser d'une façon très nette les bases du procédé employé. Ainsi qu'on l'a vu dans ce qui précède, nous sommes d'avis que pour le moment il ne peut guère être question de faire usage d'aucune autre méthode étalon que le mesurage électrométrique, quelle que soit la teneur en sel de la solution à examiner.

Février 1910.

Emil Chr. Hansen

EMIL CHRISTIAN HANSEN.

SA VIE ET SON ŒUVRE.

PAR

ALB. KLÖCKER.

La présente biographie, pour laquelle j'ai eu l'occasion d'utiliser les notes personnelles laissées par Hansen, a été écrite sur la demande de la direction du Laboratoire de Carlsberg.

EMIL[1]) CHRISTIAN HANSEN, qui était fils de Joseph Christian Hansen, peintre en bâtiments, et de Ane Cathrina née Dyhre, naquit à Ribe le 8 mai 1842.

Son père avait mené une vie très aventurière. Certaines allusions qu'il laissa parfois échapper, ont pu faire supposer qu'il était un enfant naturel d'origine aristocratique; il eut soin toutefois de n'en plus jamais parler lorsque ses enfants furent grands. Il était né à Copenhague et avait été mis en nourrice chez une vieille femme; le directeur de l'Ecole Normale de Jonstrup le prit plus tard chez lui. Après sa confirmation, il s'engagea comme mousse à bord d'un navire; mais au bout de sept mois, il renonça à la carrière maritime pour faire son apprentissage de peintre à Odensée. Il y resta trois ans, puis il partit pour l'étranger, où il travailla de son état. A Bremerhafen, il peignit des vaisseaux, et à Carlsruhe des décors pour le théâtre, où même il figura comme choriste. C'est surtout le sud de l'Allemagne qu'il parcourut dans tous les sens, peignant également des paysages et des portraits.

Peu de temps après 1830, il s'engagea en Algérie dans la

[1]) Dans les registres de la cathédrale de Ribe où il a été baptisé, son nom est écrit Emiel; mais déjà à l'école il écrivait son nom Emil.

légion étrangère et prit part aux combats contre Abd-el-Kader. En 1835, la légion passa en Espagne pour combattre Don Carlos; il prit part à plusieurs batailles et fut blessé en 1837. Plus tard, ayant été compromis dans quelques émeutes en France, il fut expulsé de ce pays et, dans le courant de l'hiver 1838, il arriva au Slesvig, faisant la dernière partie de ce long trajet pieds-nus dans la neige. Il poussa une pointe jusqu'à Copenhague, puis il revint à Haderslev, où il travailla de son métier de peintre et fut surnommé »le fou de Copenhague«. C'est pendant son séjour à Haderslev qu'il se fiança à Ane Cathrina Dyhre, dont le père était à la fois tailleur, cabaretier et laboureur. Il se rendit ensuite à pied à Ribe, où il gagna la maîtrise et où il se maria le 19 juin 1841. Les jeunes époux allèrent habiter une petite maison au bord de la Nipsaa près de la Nörreport (porte du Nord), et c'est là que vit le jour leur premier-né: Emil Christian Hansen.

L'enfant reçut les premières notions d'instruction dans une école enfantine tenue par Madame Gundersen, dans la Grönnegade (rue Verte), puis, dans celle de Madame Björn, Bispegade (rue de l'Evêque). Dès qu'il put marcher, son père l'emmena avec lui dans ses courses en campagne, en hiver comme en été, quelque temps qu'il fît. Souvent ils ne rentraient que bien avant dans la nuit, le bambin sur les bras de son père, qui avait avalé plus d'un petit verre; mainte fois ils s'égaraient dans l'obscurité. En hiver, il arrivait parfois que le pauvre petit était transi de froid au point de ne plus pouvoir se tenir sur les jambes. En route, son père lui racontait de préférence des aventures guerrières, qui finissaient invariablement par ce dicton: »On peut tout ce que l'on veut; vouloir, c'est pouvoir«.

L'enfant entendit si souvent ces paroles qu'elles lui firent sûrement une impression pour toute sa vie.

N'étant encore âgé que de 5 ans, il rentrait une nuit avec son père d'une course à la campagne, traînant tous deux une voiture à bras chargée de tout l'attirail d'un peintre; au milieu de la route, la voiture se brise, et le père continue son chemin avec autant de bidons qu'il en peut porter, laissant la garde de

la voiture à cet enfant de cinq ans, qui dut ainsi rester sur la route dans la nuit noire jusqu'à ce que son père pût revenir. Une autre fois, celui-ci lui ayant ordonné de se jeter dans une mare d'eau profonde où il ne pouvait pas prendre pied, le pauvre enfant n'osa pas désobéir, mais, comme il ne savait pas nager, il alla au fond de l'eau, où son père à demi vêtu dut se jeter a son tour pour l'en retirer. Encore tout jeune enfant, il dut maintes fois rester bien avant dans la nuit auprès de son père, parce que sa mère lui avait bien recommandé de ne pas le quitter, pendant qu'il buvait verre sur verre dans une guinguette quelconque.

Les années de la guerre de 1848 à 1850, firent sur l'esprit de l'enfant une impression ineffaçable. Son père, n'ayant pas beaucoup de travail pendant ce temps-là, fit de l'espionnage pour le compte de l'armée danoise.

La guerre terminée, le garçonnet fut mis à l'école primaire où, cependant, il n'apprit pas grand'chose; par contre, il y prit de mauvaises habitudes, comme, par ex., celle de faire l'école buissonnière, à l'exemple de ses camarades. Plus tard, on le mit à l'école payante. Là, il eut au commencement beaucoup de peine à suivre, surtout pour le calcul; mais il ne tarda pas à devenir le meilleur élève de l'école. L'amour de l'étude, un désir insatiable d'apprendre lui étaient venus. En même temps, il devint sauvage et renfermé, accablé par le sérieux de la vie que déjà il avait appris à connaître à un degré peu ordinaire. Ses parents devenaient de plus en plus pauvres. Leur famille s'étant accrue, ils tombèrent dans une gêne telle qu'ils n'avaient pas à dîner tous les jours. En été, cela pouvait encore passer, mais, en hiver, la famille se trouvait dans une position bien triste. C'est alors que le père Hansen et son fils Emil parcoururent le pays pour ramasser les vieux débris de fer et de plomb, qu'ils revendaient ensuite. Pendant la mauvaise saison, ils gagnaient aussi quelque peu en peignant des stores qu'ils allaient vendre au Slesvig.

Un peu plus âgé, le jeune Hansen se fit quelque argent en faisant des commissions et des copies pour des avoués. Pendant

ses deux dernieres annees d'ecole, il donna en outre des répétitions à des élèves peu doués.

Tout le temps dont il pouvait disposer, il l'employait à etudier, principalement l'histoire naturelle, qui l'intéressait tout particulierement. Une grammaire française et une grammaire espagnole etant un jour tombées par hasard entre ses mains, il commença alors à etudier ces deux langues sans le secours d'aucun maitre.

Il semble que quelque chose de la nature bohême du père s'etait transmis au fils, chez lequel elle se manifestait surtout par un désir, un besoin de s'instruire pour atteindre les buts les plus divers. Lorsqu'une troupe de comédiens ou un cirque arrivait dans la petite ville, on chargeait les enfants de transporter les costumes au théâtre et de les reporter; en récompense, ils recevaient un billet de galerie, et ainsi ils avaient la joie d'assister au spectacle. Le jeune Hansen eut bientôt l'idée de se faire acteur. A cette fin, il se mit à étudier des rôles, voire même à s'exercer à faire des tours de passe-passe, et, dans la troupe formée par les enfants de la ville, il fut un des plus grands artistes; ce qui toutefois ne lui fit pas négliger ses études, car son désir le plus ardent était toujours d'entrer au lycée; mais, hélas! les moyens de ses parents ne le lui permirent pas.

Pendant sa dernière année d'école, le jeune Hansen fut engagé comme garçon de bureau par le proviseur du lycée pour l'aider à faire sa comptabilité. Le proviseur désira l'avoir au nombre des élèves, mais Hansen père ne fut pas d'accord avec lui: il voulait que son fils se fît marchand. Six mois avant la confirmation, — il n'avait pas encore 14 ans, — il entra en apprentissage chez un marchand du nom de Rudolphs, chez lequel il devait rester 5 années, pendant lesquelles il serait nourri et chaussé par son patron; ses parents, par contre, avaient à le vêtir. Comme il était d'usage dans ce temps-là, il eut, dès le début, à subir des mauvais traitements de la part du commis et du premier apprenti; pourtant, à partir du jour où il administra une bonne raclée a ce dernier, sa situation devint plus tolérable. Il se rendit toutefois bientôt compte qu'il n'était pas fait pour

le commerce, et il essaya d'obtenir de ses parents l'autorisation de quitter sa place; mais ses parents s'y refusèrent, car on regardait comme une honte de quitter un apprentissage avant de l'avoir terminé. Il eut alors l'idée de se faire marin et écrivit à ce sujet à un frère de sa mère qui était capitaine de navire: celui-ci, cependant, eut vite fait de l'en dissuader. A la fin, le séjour chez le marchand lui devint à tel point insupportable, qu'un dimanche, dans l'après-midi, il alla au bord de la mer et se jeta à l'eau pour nager aussi loin que possible, n'ayant plus qu'un seul désir: celui d'être englouti par les flots. Mais, saisi subitement de terreur, il employa ses dernières forces à regagner le rivage. Son apprentissage avait duré six mois, lorsque, cédant enfin à ses instances, ses parents consentirent à ce qu'il le quittât. Il pensa alors se faire pharmacien ou employé de bureau, afin de pouvoir étudier le droit pendant ses loisirs. Mais personne ne voulut avoir affaire à lui, et beaucoup le considéraient comme un détraqué. On le montrait à la jeunesse comme un terrible exemple d'un propre à rien. Il chercha aussi à être instituteur adjoint dans une école de village; partout, il trouva les portes fermées.

Il ne lui restait donc plus qu'à embrasser le métier de son père, métier qui ne lui était pas inconnu. C'est ce qu'il fit, et il se mit au travail avec une ardeur extraordinaire, si bien qu'il ne tarda pas à être en mesure de passer compagnon. A côté des travaux ordinaires de peinture, il s'adonna à des travaux plus artistiques et se mit à copier des tableaux, à dessiner et à peindre d'après nature.

A la date du 10 avril 1860, le maire de Ribe délivrait un livret à Emil Christian Hansen, compagnon peintre. Le lendemain, il partit à pied pour Haderslev, ayant en poche une somme de 5 écus. Arrivé là, il ne put obtenir de travail et se remit en route pour Aabenraa, où il réussit à en trouver. Lorsqu'il n'y en eut plus pour lui, il retourna à Haderslev et, de là, se dirigea vers le sud, demandant du travail ou l'aumône. Entre Rendsbourg et Neumünster, il se joignit à une famille de bohémiens, avec laquelle il fit route jusqu'à Nordtoff. Ils voulurent

l'emmener à Cologne, mais il s'y refusa. Ne trouvant pas de travail à Neumunster, il rebroussa chemin. Ses vêtements étaient en lambeaux, et sa chaussure prenait l'eau de toutes parts. Enfin, il regagna sa ville natale.

C'était l'hiver et, partant, la morte-saison pour les peintres en bâtiments. Il employa alors son temps à copier le grand tableau de l'église Ste Catherine, représentant le Christ montant au Calvaire, peint par le professeur Jens Roed. Ce travail de notre jeune peintre plut à M. Helms, alors professeur au lycée de Ribe, qui écrivit sur ce sujet dans le quotidien local, à la suite de quoi Hansen envoya son tableau à Copenhague et s'y rendit lui-même en traversant à pied le Jutland jusqu'à Kolding, où il s'embarqua.

Il voulait tenter la fortune comme artiste. Il alla trouver le professeur Roed et lui montra son travail qui, malheureusement, ne trouva qu'une approbation relative de la part du maître: celui-ci lui dit que la formation élémentaire lui manquait, et lui donna le conseil d'apprendre à dessiner. Voilà donc encore un espoir déçu! Hansen renvoya le tableau à Ribe, où il fut acheté par Madame Bang, veuve de pasteur; à sa mort, il passa dans la possession du pasteur Moe, dans la famille de qui il se trouve encore aujourd'hui.

Hansen alla alors à Roskilde pour y chercher le travail qu'il n'avait pu se procurer à Copenhague. A Roskilde, il en fut de même, et il dut continuer sa route jusqu'à Holbæk, où il réussit mieux. Plus tard, il alla à Ringsted, d'où il retourna à Copenhague avec le peu d'argent qu'il avait pu économiser. Aussitôt arrivé dans la capitale, il se présenta à l'Académie des Beaux-arts, mais il ne fut pas admis. Cet échec lui fit définitivement abandonner les arts pour se remettre à l'étude, dans l'intention de se préparer à l'examen de maître d'école. Pendant cette période, il gagna sa vie en dessinant et en donnant des leçons. Il fit aussi la comptabilité d'un brocanteur et accompagna celui-ci dans un voyage qu'il fit pour aller à des ventes publiques. Cependant, comme il avait de la peine à pourvoir à sa subsistance, il lui vint l'idée d'aller d'abord en Allemagne et, de là, dans le

nord de l'Italie pour s'enrôler comme volontaire dans l'armée de Garibaldi. Mais il ne donna pas suite à cette idée, car, un beau matin, il reçut l'information qu'il pouvait obtenir la place de précepteur des enfants d'un fermier et de ceux de l'intendant de Holsteinborg. Parmi les nombreux billets envoyés en réponse à une annonce, le sien, par hasard, avait été accepté.

Ce résultat était pour lui un bonheur incroyable. Il se livra avec ardeur à l'étude des sciences naturelles, et c'est à cette époque qu'il se lia d'amitié avec un maître d'école à Oerslev — à deux lieues de Holsteinborg — du nom de P. Nielsen, connu plus tard comme consulteur agricole. C'est lui qui donna an jeune Hansen les premières notions sur la détermination des plantes, et c'est alors que Hansen se mit à collectionner des plantes et des insectes.

Il continua maintenant ses études d'une façon régulière en vue de passer d'abord l'examen de maître d'école et ensuite le baccalauréat. Le précepteur du Comte de Holstein, M. Bay, l'aida à apprendre le latin. En 1864, il se rendit à Copenhague pour y suivre les cours de l'Ecole normale de Blaagaard, et, la même année, pendant la guerre, il passa l'examen de maître d'école. Là-dessus, il se présenta au recrutement, mais, comme il était myope et portait des lunettes, il ne fut pas admis, pas plus qu'il ne l'avait été lorsqu'il s'était présenté à l'Ecole des officiers de réserve. Alors, il retourna à Holsteinborg pour y reprendre son préceptorat et se préparer en même temps à l'examen de la première partie du baccalauréat, qu'il passa à Copenhague en 1865. Cela fait, il prit de nouveau une place de précepteur, cette fois dans l'île de Fionie, et pendant cette période il étudia principalement la botanique. Il pensait alors à se faire vétérinaire ou, encore mieux, a prendre ses grades de médecin, mais par suite du surmenage auquel il s'était astreint pendant sa préparation aux examens qu'il venait de passer, sa santé laissait beaucoup à désirer, et, d'ailleurs, les ressources lui faisaient défaut pour continuer ses études. Il sollicita alors la bourse de la donation Monrad en faveur des instituteurs pour les mettre à même de suivre les cours de l'Ecole polytechnique pendant trois

ans. Il fut assez heureux pour l'obtenir et, en 1866, il revint à Copenhague pour y commencer ses études. Malheureusement, sa santé ne laissait pas que d'être mauvaise et, pour comble, il fut atteint de la fièvre typhoïde. Il fut malade pendant trois longs mois et, pendant ce laps de temps, ses camarades prirent une si grande avance sur lui qu'il ne lui resta plus qu'à choisir entre ces deux alternatives: ou bien renoncer à continuer ses études ou s'y remettre avec le même excès d'ardeur qu'auparavant. Il choisit la reprise des études et, sa santé n'ayant cette fois pas souffert de son excès de travail, il passa un bon examen (1869).

Entre temps, afin de se procurer quelques revenus pour les moments difficiles, il écrivit quelques récits et nouvelles, tantôt sous le voile de l'anonyme, tantôt sous les initiales E. C.[1]).

Quelque temps après, il fut attaché à l'école mixte Schneekloth comme professeur d'anglais et d'histoire naturelle; en même temps, il donnait des répétitions de zoologie et de botanique aux étudiants en médecine et aux élèves de l'Académie royale vétérinaire et d'agriculture. En 1871, il passa la seconde partie du baccalauréat, et six mois après, il terminait son cours de philosophie.

Ce fut, de tous ses professeurs, le célèbre zoologiste, le Professeur J. C. Schiödte, qui fit sur lui la plus forte impression et, pendant quelque temps, la zoologie fut sa branche de prédilection. Mais bientôt, il se sentit de plus en plus attiré vers la physiologie végétale. Cependant, avant de pouvoir se livrer à

[1]) On ignore si Hansen a écrit d'autres ouvrages de ce genre que ceux cités ci-après. Quoi qu'il en soit, je n'ai pas pu en découvrir d'autres.

1869. (Anonyme). Carl Holms Historie.
[L'histoire de Charles Holm].
(Aftenlæsning. Ny Række, 10. Bind. Hefte 3, 1869).

1869. (Anonyme). Episode fra Spaniernes Ophold i Jylland 1808.
[Episode du séjour des Espagnols en Jutlande en 1808].
(Tillæg til [Supplément de] Illustreret Tidende, 14 Nov. 1869).

1870. (E. C.). En gammel Mands Kiærlighed.
[L'amour d'un vieillard].
(Folkekalender for Danmark, 1870).

cet attrait, il fut engagé par le Professeur Jap. Steenstrup pour l'aider dans ses recherches sur les tourbières.

Au cours de ces nouveaux travaux, Hansen, examinant une tourbière dans le nord de l'île de Séeland, Femsolyng, arriva à des résultats allant à l'encontre de la manière de voir de Steenstrup; c'est ainsi que Hansen constata que le hêtre et le frêne appartiennent aux couches relativement anciennes des tourbières. Immédiatement, Steenstrup se rendit dans la tourbière susnommée afin de contrôler l'exactitude des constatations de Hansen; puis, il lui proposa de publier ses observations en les intercalant sous forme d'un chapitre spécial dans un travail important qu'il comptait faire paraître dans les Comptes-rendus de l'Académie Royale des Sciences Hansen accepta cette proposition avec reconnaissance, mais ce travail auquel Steenstrup faisait allusion, ne parut jamais, pas plus d'ailleurs qu'on n'en trouva le manuscrit après sa mort.

Par contre, à la »Société d'histoire naturelle«, dont Steenstrup était alors président, Hansen donna une conférence sur le résultat de ses observations, conférence qui fut reproduite dans les »Communications scientifiques de l'Association d'Histoire naturelle« (2)[1]).

Hansen continua ses recherches sur les tourbières pendant plusieurs années, et il a laissé un certain nombre d'analyses qui, cependant, selon son désir, ne seront pas publiées.

La découverte ci-dessus mentionnée suivie de la conférence s'y rattachant, aurait, au dire de Hansen, donné lieu à une certaine froideur entre Steenstrup et lui, froideur que Hansen allait même jusqu'à taxer d'hostile, à tort, pourtant, à ce qu'il paraît, car c'est sur la recommandation de Steenstrup que Hansen fut plus tard attaché au Laboratoire de Carlsberg.

En 1875, il adressa une demande de secours à la Donation Classen, qui lui accorda une somme de 300 couronnes danoises, subvention qui fut renouvelée l'année suivante.

[1]) Les numéros mis entre parenthèses renvoient à la Table chronologique des publications de Hansen.

En 1874, l'Université de Copenhague avait mis au concours une question conçue dans les termes que voici: »On demande une description systematique détaillée des champignons danois dont la vie semble être attachée aux excréments, restés intacts, de mammifères«. Hansen concourut et, en 1876, la médaille d'or de l'Université lui fut décernée. L'appréciation de son mémoire était conçue en des termes très flatteurs; c'est ainsi que la remarque finale dit: »Nous regardons ce mémoire comme étant une monographie basée sur un travail infatigable et intelligent, la première comprenant en son entier la question proposée au concours, et nous estimons ce beau travail digne du prix attaché à la meilleure réponse«. C'était signé Japetus Steenstrup, Fr. Johnstrup et F. Didrichsen. Ainsi donc, on rendait justice aux travaux fort étendus accomplis par le lauréat pendant les deux années avant l'expiration desquelles il devait présenter son mémoire au concours. En même temps que le texte de ce mémoire, il avait envoyé à l'Université des preuves à l'appui: un volume renfermant 57 feuillets de dessins, dont une partie colorés, et des explications détaillées; un fort volume de collections d'objets desséchés; 179 bocaux contenant des spécimens, pour la plupart très riches, conservés dans l'alcool, et, enfin, 5 boîtes renfermant des préparations microscopiques admirablement exécutées. Une partie de son mémoire parut dans les »Communications de l'Association d'Histoire naturelle à Copenhague«, en 1876 (4).

En 1877, le Professeur Panum fit auprès de Hansen une démarche pour lui proposer d'entreprendre avec lui des recherches sur la fermentation, et Hansen, ayant accepté ce travail, fut ainsi amené à s'occuper de la physiologie de la fermentation. L'année précédente, M. Rasmus Pedersen, chef du service physiologique du Laboratoire de Carlsberg, avait proposé à Hansen la place d'adjoint à ce service, sans que pourtant il en soit résulté quelque chose.

A cette même époque, Hansen remettait au Sénat académique une pétition par laquelle il demandait l'autorisation de soutenir la thèse pour le grade de docteur sans avoir passé la licence.

Comme le souvenir des aigres contestations qui avaient envenimé les esprits lorsque M. P. Tauber avait soutenu sa these de docteur sans pourtant en obtenir le grade, était encore présent a la mémoire de tous, les membres du Sénat étaient loin d'être d'accord sur la question de savoir s'il fallait obtempérer au désir de Hansen. On finit pourtant par y accéder, et Hansen commença alors au Laboratoire physiologique de Panum les recherches microbiologiques qui devinrent la base de ses futurs travaux. Ces études portèrent sur les microorganismes qui se trouvent dans la bière et dans le moût de biére. En même temps, le Ministère de l'instruction publique lui accordait la somme de 300 couronnes pour la continuation de ses études sur les tourbières.

A cette époque-là, M. Carl Jacobsen, fondateur et propriétaire de la brasserie Nouveau-Carlsberg, cherchait un jeune homme ayant fait des études scientifiques sérieuses, capable de procéder, journellement et pendant un certain temps, à un examen au microscope des bières de la brasserie: sur la recommandation de M. Steenstrup, ce travail fut confié à Hansen à partir du 1er juillet 1877.

Sur ces entrefaites, il arriva que M. R. Pedersen ayant donné sa démission, le poste de chef du service physiologique du Laboratoire de Carlsberg devint vacant, et Hansen, qui désirait vivement ce poste, commença, avec l'autorisation de M. Jacobsen père, à travailler dans le laboratoire de Carlsberg à partir du 1er janvier 1878. A la faveur des excellentes conditions de travail dont il jouissait ici, — c'est ainsi, entre autres, qu'on lui avait donné un logement dans une des dépendances de la brasserie du Vieux-Carlsberg, tout près du laboratoire, — il se mit sérieusement aux études qui devaient lui servir à passer son doctorat. Au commencement de 1879, il présentait à l'Université sa thèse intitulée: »Sur les organismes vivant dans la bière et dans le moût de bière«. (9).

Pendant cette période, Hansen travailla jour et nuit, et M. Jacobsen s'intéressait vivement à ses travaux; mais ses visites au laboratoire n'étaient pas toujours sans déranger Hansen, si bien qu'un jour celui ci finit par le prier de s'en aller et de le laisser

travailler en paix. M. Jacobsen prit la porte, et Hansen pensa qu'il avait été trop loin et que, probablement, lui aussi serait «mis à la porte» du laboratoire. Mais, M. Jacobsen tourna plus tard cet incident en plaisanterie.

Hansen soutint sa thèse le 25 avril 1879; les argumentants d'office furent le professeur Didrichsen et le Dr. E. Warming, tandis que les argumentants *ex auditorio* furent le professeur Panum, M. V. A. Poulsen et M. Tauber; la séance dura de 11 heures à 4 1/2 heures.

A partir du 1er janvier 1879, Hansen avait été chargé de la direction provisoire du service physiologique du Laboratoire de Carlsberg avec les appointements ordinaires du directeur; ce ne fut qu'à partir du 1er octobre de la même année que sa nomination devint effective.

Le 30 mars 1880, il épousait Melle Mathilde Melchior, jusqu'alors femme de charge à Vieux-Carlsberg; la cérémonie eut lieu dans l'église du Château de Holsteinborg.

1883 fut, sans contredit, une année des plus importantes de la vie de Hansen, car ce fut en cette année-là qu'il fit connaître son système de la Culture pure de la levure, et celle où la brasserie Carlsberg fit le premier essai de sa levure pure.

Grâce à ses recherches sur les microorganismes de l'air, Hansen avait trouvé qu'une levure, qu'il appelait alors Saccharomyces Pastorianus I, apparaissait fréquemment dans l'air pendant les mois d'été. La bière produite à l'aide de ce ferment était de très mauvaise qualité, son goût et son odeur étaient désagréables. Hansen avait élaboré une méthode pour l'isolation d'une cellule unique de levure, méthode qui lui avait permis de préparer des cultures absolument pures. Comme, à cette époque-là, la brasserie Tuborg avait à lutter contre de grandes difficultés de fabrication, les bières devenant troubles quelques jours après leur mise en bouteilles, Hansen fit l'examen du levain de cette brasserie et, au moyen de sa méthode de culture pure, il en isola 3 espèces de levure différentes. Le levain employé par la brasserie Tuborg, était constitué en majeure partie d'une de ces trois espèces, qui, ensemencée seule dans le moût, donnait un

produit irréprochable et de bonne conservation; mais, sitôt que l'une des deux autres espèces de levure, ou toutes deux ensemble, se trouvaient dans le liquide pendant la fermentation, ces bieres redevenaient troubles. Quelque temps après, des difficultés analogues surgirent dans la brasserie Vieux-Carlsberg: la bière avait perdu sa qualité habituelle, son goût était devenu moins pur, son odeur moins fine, et elle se conservait moins bien. M. C. Jacobsen attribuait les difficultés qui s'étaient produites à Tuborg à une fermentation trop faible, tandis que, pour les défauts constatés dans la bière de Vieux-Carlsberg, d'accord en cela avec la manière de voir de Pasteur, il les attribuait à une infection par des bactéries. Aussi, c'est pourquoi il eut, au commencement, de la peine à admettre l'opinion de Hansen, que, dans les deux cas, le mal était dû à la présence de »levure sauvage«; mais il dut cependant s'incliner devant les résultats des expériences, et, à partir de ce jour, il suivit avec un vif intérêt les efforts de Hansen pour arriver à isoler une levure pure et bonne du levain employé jusqu'alors. Du levain de la brasserie Carlsberg, Hansen isola 4 espèces différentes, dont une seulement donnait de la bière normale, à savoir celle connue plus tard sous la désignation de *Levure basse N° 1* de *Carlsberg*. Une autre espèce était la levure de maladie mentionnée plus haut: Saccharomyces Pastorianus I.

Hansen étant enfin parvenu à produire de la levure pure (Levure basse de Carlsberg N° 1) en quantité suffisante pour en ensemencer une cuve à fermentation, la levure pure fut employée pour la première fois dans la fabrication de la bière Vieux-Carlsberg le 12 novembre 1883.

Au sujet de la possibilité d'accomplir au moyen d'une seule espèce de levure, non seulement la fermentation principale, mais aussi la fermentation secondaire, Jacobsen avait émis des doutes, s'appuyant sur l'opinion généralement admise à cette époque-là, d'après laquelle les deux fermentations exigeaient chacune leur espèce. Mais le résultat de ce premier brassin pour lequel on avait fait usage de la levure pure de Hansen, était concluant: aussi les hésitations de Jacobsen furent vaincues, et, à partir

de ce moment, il fit valoir la grande considération dont il jouissait pour donner au plus vite à cette réforme la plus grande extension possible; il fit, à cet effet, des communications à plusieurs brasseurs renommés et mit à leur dispositon de la levure pure à titre d'essai.

Dans la pensée que ses decouvertes devraient aussi servir à l'augmentation des revenus de la brasserie Vieux-Carlsberg, Hansen proposa à M. Jacobsen de fonder un grand institut où non seulement on produirait de la levure pure pour en fournir les brasseries de tous les pays du monde, mais où en même temps on donnerait aussi des cours y relatifs. Mais Jacobsen ne voulut pas en entendre parler: tout ce qui provenait du Laboratoire de Carlsberg appartenait au monde entier. Ce furent de grosses sommes que M. Jacobsen donna ainsi à pleines mains.

Hansen inaugura en 1884, au Laboratoire de Carlsberg, ses cours sur l'emploi de sa découverte. Au nombre des auditeurs qui y prirent part, se trouvèrent des hommes aussi connus que le Dr W. Schultze, directeur de la brasserie Liesinger à Vienne, le professeur Thausing à Mödling, M. Aubry, directeur à Munich, et M. Ulrich, brasseur à Pfungstadt. Ces cours se continuèrent dans la suite, et nombreux sont les chimistes et les botanistes qui y ont appris les méthodes de recherches employées au Laboratoire de Carlsberg.

En 1889, Hansen fut nommé chevalier de l'Ordre du Danebrog; en 1890, il fut reçu membre de l'Académie Royale des Lettres et des Sciences, et en 1891, à la demande de la Direction du Laboratoire de Carlsberg, on lui décerna le titre honorifique de professeur.

C'est pendant ces mêmes années que se place la polémique qu'il eut avec M. Duclaux, professeur à l'Institut Pasteur à Paris, et M. Velten, brasseur à Marseille.

Hansen avait démontré que la méthode indiquée par Pasteur pour purifier la levure de brasserie des germes de maladie, n'était pas bonne, attendu qu'elle pouvait donner et que, effectivement, elle donnait souvent des résultats absolument contraires à ceux que l'on désirait en obtenir. En effet, Pasteur partait de cette

hypothèse que les maladies de la bière sont dues à la présence de bactéries, et, comme généralement celles-ci, ou périssent, ou s'affaiblissent grandement dès qu'elles se trouvent dans des liquides acides, il avait recommandé de purifier la levure en la cultivant dans une solution de sucre additionnée d'acide tartrique. Or, Hansen avait prouvé non seulement que les maladies de la bière les plus fréquentes et les plus dangereuses ne sont nullement dues à la présence de bactéries, mais bien à celle de levures sauvages; mais il avait aussi prouvé que justement ces levures apportent une résistance beaucoup plus grande au traitement recommandé par Pasteur, que la levure de culture, qui peut même en périr, de sorte que, en suivant le conseil de Pasteur, on obtient une augmentation des levures de maladies, c. à. d. que, loin de purifier et de bonifier la levure, ce traitement la rend plus mauvaise et plus impure encore, à tel point que Hansen basa là-dessus sa méthode, la seule connue à ce jour, permettant de constater dans de la levure industrielle la présence d'une trace de levure sauvage. Il est facile de comprendre que ce résultat ne fut pas bien accueilli en France: Duclaux et Velten ne voulurent pas admettre l'exactitude des constatations de Hansen et continuèrent à tenir pour la méthode de Pasteur.

En 1893, Hansen termina ses recherches dans la pratique de l'industrie de la fermentation. A cette occasion, la direction de la Fondation Carlsberg lui fit don d'une somme de 20000 couronnes.

En 1902, il célébra le 25ème anniversaire de son entrée au Laboratoire de Carlsberg. Au moyen d'une souscription internationale, on avait recueilli une somme assez forte, qui permit de remettre au jubilaire une médaille d'or et un don en espèces. En les lui remettant au nom du Comité, le Dr Carl Jacobsen, directeur de la brasserie Nouveau-Carlsberg, lut l'adresse suivante:

«Il y a aujourd'hui 25 ans, Monsieur le Professeur, que vous commenciez vos savants travaux dans les brasseries Carlsberg et au service physiologique du Laboratoire de Carlsberg. Votre mérite est connu et apprécié, non seulement dans votre pays natal, mais bien au delà de ses limites. Vos travaux ont provo-

que un puissant progrès dans la biologie des organismes de fermentation, et vos enseignements sur l'application à l'industrie de la fermentation de races de levures cultivées à l'état de pureté et méthodiquement sélectionnées, ont amené des réformes d'une importance extraordinaire.

Nous, soussignés, nous sommes réunis pour vous remettre aujourd'hui une médaille d'or en témoignage de la considération et de la reconnaissance avec laquelle nous apprécions les observations ingénieuses et initiatrices auxquelles vous vous livrez depuis un quart de siècle».

Suivaient 63 noms des pays les plus divers; le nombre des souscripteurs s'élevait à environ 500, sans compter plusieurs grandes associations.

La Fondation Carlsberg remettait également à Hansen, à cette occasion, un don de 5000 couronnes.

En novembre 1908, on fêta un second jubilé à Carlsberg: il y avait 25 ans, le 12 novembre, que la brasserie du Vieux Carlsberg avait employé, pour la première fois, de la *levure pure* comme levure d'ensemencement. Ce fut l'occasion d'une nouvelle fête en l'honneur de Hansen: La Fondation Carlsberg lui fit à nouveau un don qui, cette fois-ci, se monta à 10000 couronnes; l'Association des Brasseurs danois lui en remit un de 20000 couronnes; et il fut nommé commandeur de l'Ordre du Danebrog, distinction d'autant plus grande qu'elle lui fut accordée sans qu'il eût d'abord été décoré de la Croix d'argent de cet Ordre.

L'année 1909 commença sous des auspices bien tristes pour Hansen. Sa femme était malade, et son état allait toujours s'aggravant. Il s'en affectait beaucoup, et il attendait avec impatience une amélioration qui leur permit à tous deux d'aller passer quelque temps à la campagne. Malheureusement, la maladie de sa femme s'aggravait encore. Hansen en souffrait beaucoup, et, de plus, il se tourmentait extrêmement d'un commencement de surdité dont il venait d'être atteint et qui le gagnait de plus en plus. Sentant ses forces physiques et intellectuelles décroître de jour en jour, et, tout espoir étant perdu de voir sa femme

se remettre suffisamment pour pouvoir l'accompagner à la campagne, il se décida à partir seul. Il reçut sa nomination de docteur honoraire ès-sciences naturelles de l'Université de Genève, mais, à ce moment-là, il était déjà si gravement atteint, qu'il n'accorda aucune attention à cette distinction honorifique. Il avait choisi Hornbæk pour lieu de séjour et avait déjà loué une chambre dans une pension de famille, mais, au dernier moment, il se sentit si faible qu'il se ravisa, et ce fut au Sanatorium qu'il se rendit. A son arrivée, il avait la fièvre, et il dut s'aliter pour ne plus se lever. Il déclina avec une rapidité extraordinaire et, le 27 août, il expira. D'après le certificat de décès, Hansen est mort des suites d'un catarrhe intestinal; aucune autre maladie n'a pu être constatée avec certitude; mais il ne peut guère y avoir de doute que la véritable cause du décès n'ait été un cancer du foie.

Avant d'être attaché au Laboratoire de Carlsberg, Hansen s'occupait principalement de recherches botaniques, et surtout de la morphologie et de la biologie des champignons supérieurs. Au fond, ce ne fut qu'à la suite des bonnes conditions de travail que lui procura sa nomination de chef de service de notre laboratoire (au commencement de 1878) que ses travaux prirent une direction expérimentale et physiologique; à dater de ce moment-là, il se livra à l'étude des microorganismes au sens le plus étendu du mot (bactéries, levures et moisissures); puis, après quelque temps de recherches préliminaires, il concentra toute son attention aux Saccharomycètes. Cette période introductive dura du commencement de 1878 jusque vers la fin de 1879; puis vient la deuxième période, qui s'étend de la fin de 1879 au commencement de 1889, pour, de là, passer insensiblement dans la troisième et dernière période.

Dans la deuxième période, ses travaux portèrent principalement sur l'élaboration de la technique des expériences microbiologiques, sur celle de la méthodologie et des études sur les espèces et variétés des Saccharomyces, telles qu'elles se rencontrent dans l'industrie et dans la nature; ils portèrent également

sur les recherches concernant la circulation des levures dans la nature. Pendant cette époque, ses investigations partaient principalement de ce point de vue que les types des Saccharomyces qu'il étudiait presentent des caracteres constants; mais, dès le début, deja, il s'etait rendu compte qu'il y a des variations. Toutefois, et surtout au commencement de cette deuxième période, il ne fit que tout a fait occasionnellement des recherches sur la variation. Et les principes sur lesquels il se basa plus tard, différèrent entièrement de ceux que, chacun dans son genre, Reess et Pasteur, ses devanciers les plus conséquents dans ce domaine, avaient pris pour base. Pour Pasteur, toutes les cellules de levure qui provoquaient une fermentation alcoolique tant soit peu marquée, étaient à rapporter au genre Saccharomyces, ne faisant aucune distinction entre Saccharomycètes et Non-Saccharomycètes: et ainsi se trouvaient mélangées des espèces appartenant à des divisions toutes différentes du système. Dans ces conditions il ne pouvait donc pas être question d'une étude scientifique des espèces, et, quant à les étudier en se basant sur la botanique, Pasteur n'en eut jamais l'idée, ses études, aussi bien que son attrait naturel, l'ayant dirigé dans un autre sens.

Quant à Reess, il s'était bien aperçu qu'il existe dans la nature un groupe particulier de cellules de levure qui se distinguent des autres par une sporulation endogène, ce qui l'avait conduit à établir le genre Saccharomyces par opposition aux autres cellules de levure. Mais, n'étant pas, à proprement parler, expérimentateur, il se bornait à faire la description des types qu'il rencontrait dans la nature, et ainsi, par conséquent, suivant l'usage généralement adopté dans ce temps-là par les botanistes, il établissait les espèces d'après la forme et les dimensions de ces types, sans se rendre compte que ces caractères sont sujets a de fortes variations, selon les conditions de milieu et de température. Hansen montra qu'en partant de n'importe lequel des types établis par Reess comme des espèces indépendantes, on peut developper tous les autres types. Ainsi, par ex., d'un type qui, selon Reess, est un Saccharomyces cerevisiæ, on peut développer des types de levure appartenant — toujours suivant Reess

— aux espèces Sacch. ellipsoïdeus, Sacch. Pastorianus ou Sacch. exiguus. Par elles-mêmes, la forme et la grandeur de la cellule ne donnent pas de caractères distinctifs: on n'en obtient que par leurs rapports avec les facteurs dont elles dépendent. L'examen de ces espèces demande donc une désignation plus complète des facteurs, d'où il s'ensuit que cet examen devient alors d'ordre expérimental. Ainsi, les noms systématiques de Reess ne désignent donc point des espèces bien définies.

En étudiant aussi cette question sous d'autres points de vue, Hansen arriva à faire connaître de nouveaux caractères; citons, comme particulièrement importantes sous ce rapport, ses recherches sur la manière dont se comportent les levures de fermentation alcoolique vis-à-vis des divers sucres, et celles sur les températures limites de la croissance végétative et de la formation des spores. Plus tard, il établit la loi que la température maxima de croissance végétative est toujours de quelques degrés supérieure à celle de la sporulation, et que la température minima de la croissance est inférieure à celle de la sporulation.

Afin d'éviter provisoirement d'introduire de nouveaux noms dans le système, Hansen se servit des noms spécifiques de Reess pour désigner certains groupes comprenant plusieurs espèces dont on n'a examiné jusqu'ici qu'un nombre restreint.

Afin de mieux faire comprendre les nouveaux points de vue et les méthodes nouvelles dont il partait, il publia en 1883 ses recherches sur 6 espèces différentes; plus tard, il traita d'autres espèces qui se distinguaient par des particularités d'ordre physiologique ou morphologique. A ses yeux, sa tâche était d'ouvrir une voie nouvelle et de montrer le chemin à suivre, et non pas de décrire lui-même les espèces nombreuses. Et c'est ainsi que, par ses travaux, il contribua à la morphologie, à la biologie et à la physiologie générales des Saccharomycètes. En 1896, le Dr Windisch, professeur à Berlin, un des adversaires d'autrefois de Hansen, en parlant de ses travaux, arrivait à cette conclusion, que leur importance consistait en ce qu'ils détruisaient les théories vagues et les spéculations incertaines qui régnaient partout à l'époque où Hansen entreprit ses recherches, et qu'à leur

place il avait mis des exemples et des faits expérimentaux ayant des conséquences pratiques. Et c'était précisément dans le but d'obtenir des conséquences pratiques, que Hansen s'adonna à l'étude expérimentale des Saccharomycètes. Les expériences qu'il avait faites en 1880, formèrent la base de sa doctrine concernant les levures de maladie. En 1881, il élabora une méthode exacte de culture pure, méthode à laquelle il apporta plus tard certaines améliorations.

Dans la technologie de la fermentation, Pasteur s'était placé à un autre point de vue que celui que Hansen vint à prendre plus tard. Pasteur avait constaté que certaines maladies de la bière et du vin étaient provoquées par des bactéries et, en conséquence, il avait pris à tâche de débarrasser la levure des bactéries qui pouvaient s'y être introduites. A cet effet, ainsi que nous l'avons vu dans ce qui précède, Pasteur et ses collaborateurs faisaient usage d'une solution de saccharose additionnée d'un peu d'acide tartrique. En cultivant la levure dans cette solution, on parvenait généralement, il est vrai, à la débarrasser des bactéries; mais, en revanche, on favorisait en même temps le développement des levures de maladie, ainsi que Hansen le démontra par une recherche expérimentale très étendue. C'est pourquoi le procédé de Pasteur ne pouvait pas être utilisé en pratique, ce que l'on comprend sans peine, si l'on songe que, dans ce temps-là, on ne savait pas encore distinguer la bonne levure de brasserie de la levure de maladie. Ces deux catégories n'étaient pas encore connues.

Hansen basa ses expériences sur de nouveaux points de vue et sur des méthodes nouvelles. Il prit une cellule unique, dont il fit une culture absolument pure; puis il étudia l'espèce au point de vue botanique et physiologique et parvint ainsi à établir la démarcation entre la levure de maladie et la levure de culture. C'est la première fois que, dans ce domaine, on arriva à se procurer des points de départ bien sûrs et à attacher aux noms systématiques la description de types bien définis. L'introduction dans la pratique de la culture pure de l'espèce méthodiquement sélectionnée fut la conséquence des travaux de Hansen.

Lorsque, en 1883, Hansen introduisit sa nouvelle théorie dans l'industrie de la fermentation, il rencontra une résistance qui, en partie du moins, était justifiée; car, ce n'est que longtemps après qu'il parvint à établir la démonstration complete de son exactitude. M. A. W. Hofmann, chimiste allemand, dit quelque part dans ses écrits, que seul celui qui possède un »ungestümen Trieb«, est capable de résoudre le problème qui se pose lorsqu'il s'agit d'ouvrir une nouvelle voie dans le domaine de l'industrie et dans celui de la vie pratique. C'est ainsi que cela n'avait pas été suffisant pour Hansen d'être parti d'idées justes: un travail de beaucoup plus grand et plus difficile lui restait a accomplir, c'est-à-dire, lutter pendant de longues années, autant contre les théoriciens que contre les praticiens de l'industrie, pour faire accepter sa réforme dans la vie pratique.

A partir de ce moment-là, les recherches de Hansen se portèrent constamment dans deux directions. Au commencement, il ne travaillait que partant de points de vue purement théoriques; mais, peu à peu, il vit surgir à côté les conséquences pratiques de ses théories, et, sans en avoir conscience, pour ainsi dire, il avait été amené à suivre cette double direction pour ses travaux futurs.

Une nouvelle période dans les travaux de Hansen, la troisième et dernière, commença avec l'année 1889. Nous avons déja dit que les études de Hansen sur les Saccharomycètes partaient principalement de ce point de vue que ces organismes se distinguent par des caractères constants; maintenant, par contre, il fit porter ses expériences sur la variation.

Les premières variétés constantes furent préparées par Hansen en 1889, à la suite de sa découverte que, cultivés par un procédé spécial, les Saccharomycètes perdent la faculté de former des spores, et que, une fois perdue, cette faculté ne peut être recouvrée, même si on les cultive dans les conditions les plus favorables. En se livrant à ces recherches très compliquées, il avait un double but: tout d'abord, il voulait chercher à découvrir les lois qui président à la variation, afin d'éclairer les théories avancées par Darwin et d'autres savants; puis, il voulait arriver

à transformer ces microorganismes selon les besoins de l'industrie à laquelle ils devront servir, de manière à ce que dorénavant on ne fût plus réduit à faire son choix uniquement entre les espèces et variétés qu'on aurait par hasard à sa disposition. Les résultats pratiques qu'il obtint consistèrent dans le fait qu'il amena des cellules de levure à se multiplier plus fortement qu'elles ne le font dans les conditions ordinaires, à opérer dans certains cas une fermentation plus forte, dans d'autres une fermentation plus faible que leurs formes primitives, au gré de l'expérimentateur. C'est ainsi que ces recherches touchent de près le domaine de la fabrication de levure pressée et celui de la distillerie. Quant aux levures de bière, ses expériences portèrent principalement sur la levure N° 1 de Carlsberg.

A la fin de 1878 déjà, dans son premier mémoire relatif aux bactéries d'acide acétique, il part en partie du point de vue *variation*. C'est une des premières recherches expérimentales qui démontrent réellement qu'une espèce de bactérie peut se présenter sous des formes très diverses, et c'est également la première fois qu'on constata qu'une même fermentation peut être due à plusieurs espèces de bactéries. Jusqu'alors, avec Pasteur, on avait groupé toutes les bactéries d'acide acétique sous le nom de *Mycoderma aceti*, les considérant ainsi comme constituant une espèce unique. Etant donné la direction principale qu'avaient alors prise ses recherches, Hansen, dans les mémoires qu'il publia en 1893 et 1894, mit tout naturellement au premier plan l'étude des phénomènes de variation; aussi il consacre une grande partie de ces mémoires à l'investigation des divers facteurs qui donnent naissance aux formes très variées sous lesquelles se présente une seule et même espèce. Ce sont surtout des recherches sur le pouvoir morphogénique de la température. On trouve aussi, dans ce mémoire, des essais visant des questions d'ordre pratique; cependant il n'en aborde pas ayant trait à la fabrication même du vinaigre, mais se borne à laisser entrevoir la possibilité d'y appliquer aussi son système de culture pure.

L'influence qu'exerce la température sur la forme des Saccha-

romycètes fit aussi l'objet d'une série de recherches de la part de Hansen.

A de courts intervalles a reparu la théorie du pléomorphisme des Saccharomycètes, ordinairement avec la supposition que ces champignons descendent de diverses moisissures. Hansen s'opposa toujours à ces vaines hypothèses. Il demandait des recherches expérimentales, basées sur une méthode exacte et venant à l'appui d'une démonstration exacte: or, et cette méthode et cette démonstration ont toujours fait défaut. Soumises à l'épreuve expérimentale, toutes ces affirmations se sont trouvées insoutenables. On n'a jamais pu en trouver d'autre preuve que celle, bien insuffisante, d'une formation de mycélium chez les Saccharomycètes, formation déjà observée longtemps auparavant par Hansen.

Dans les dernières années de sa vie, Hansen continua à s'occuper tout particulièrement des recherches sur les variations, et il chercha surtout à éclaircir la question de savoir si, lors de la production sous l'influence de facteurs extérieurs des variétés asporogènes mentionnées ci-dessus, il s'opère une transformation, ou bien, s'il ne s'agit que d'une sélection naturelle de certaines cellules favorisées par lesdits facteurs. Il arriva à ce résultat que c'est une transformation qui s'opère et qu'elle est de nature tout à fait fixe. Elle ne s'accomplit pas tout d'un coup, mais graduellement.

Non moins intéressantes sont les expériences faites par Hansen sur les levures à fermentation haute et celles à fermentation basse. On n'ignore pas que, depuis longtemps, les opinions étaient bien partagées sur la question de savoir si ces deux formes étaient indépendantes, ou si l'une d'entre elles se développait de l'autre. Les recherches de Hansen donnèrent pour résultat que, parmi les cellules d'une levure typique à fermentation basse, il y en a qui provoquent une fermentation haute typique et que, entre celles d'une levure typique à fermentation haute, il peut s'en trouver quelques-unes qui donnent une fermentation basse typique. Combien de travail demandent de telles recherches, ressort de ce fait qu'une fois il fallut isoler 9948 cellules de levure

haute avant de trouver parmi elles une seule à fermentation basse.

Ces recherches ont donc donné pour résultat principal que les deux types physiologiques, la levure à fermentation haute et la levure à fermentation basse, ne sont pas indépendants, mais que l'un d'eux peut se développer de l'autre. Hansen a rangé ces phénomènes de variation dans la catégorie des *mutations*.

Une partie assez considérable des travaux faits par Hansen pendant ces dernières années, traite des conditions dans lesquelles se produisent le bourgeonnement et la formation des spores. Il démontra que les cellules sont à même de former des spores directement, sans bourgeonnement préalable, et de plus, que la spore elle-même peut devenir directement une cellule-mère, en sautant tous les termes intermédiaires.

Dès les premières années où il se livra à l'étude des organismes de fermentation, il chercha, ainsi que nous l'avons déjà mentionné, à élucider leur circulation dans la nature. Il y réussit quant au Sacch. apiculatus, espèce facile à reconnaître par ses cellules en forme de citron. Il constata que les foyers de production de cette levure sont les fruits doux et juteux. Lorsque ceux-ci tombent d'eux-mêmes ou qu'ils sont jetés à terre par la pluie, ou encore, lorsque, mangés par les oiseaux et les insectes, ils tombent avec leurs excréments, ce champignon se maintiendra vivant dans la terre durant tout l'hiver, jusqu'à la saison prochaine des fruits. Alors, le vent, les insectes ou d'autres petits animaux le portent sur les fruits susmentionnés, où il se fixe pour s'y multiplier dans leur jus. Aussi cette espèce se rencontre-t-elle surtout dans le sol sous les arbustes et arbres fruitiers.

De la même manière que ce petit champignon accomplit sa circulation dans la nature, les autres levures proprement dites l'accomplissent généralement, elles aussi. Cependant, les dernières recherches faites par Hansen dans ce domaine ont montré que les Saccharomycètes peuvent encore, quoique de beaucoup moins bien, se multiplier dans d'autres endroits que dans le jus abondant des fruits doux et juteux. Il en avait trouvé, en effet, assez régulièrement dans la terre à une grande distance de ce

qu'on est convenu d'appeler leurs foyers primaires, c'. a. d. des vergers et des vignes. Ces autres endroits, que Hansen dénomma »foyers secondaires«, sont de nature très différente: ce sont des pâturages, des lichens et de la mousse recouvrant les troncs d'arbre, *etc.* Toutefois, plus on s'éloigne des foyers primaires, plus rares se font ces champignons, et on n'en trouve plus trace au sommet des hautes montagnes. An moment où la mort vint l'arracher à ses travaux, Hansen s'occupait encore activement de faire des recherches sur l'existence de ces champignons dans les régions arctiques et dans celles des tropiques.

A ce propos, nous mentionnerons encore que, dans ses dernières années, Hansen établit les lignes fondamentales de la classification des Saccharomycètes, afin de mettre de l'ordre dans le chaos produit peu à peu par les descriptions des nombreuses espèces nouvelles. Ces lignes fondamentales ont été universellement adoptées dans la suite par les savants.

Pendant les derniers temps de sa vie, Hansen s'était aussi remis à l'étude des champignons supérieurs. C'était principalement à la biologie des Coprinus formant des sclératies qu'il s'attacha, dans le but de donner une suite au travail qui, dans sa jeunesse, lui avait valu la médaille d'or de l'Université. Il parvint à éclairer l'histoire du développement de trois espèces caractéristiques, fournissant par là des exemples typiques de l'évolution des Coprinus en général. Il montra comment, chez ces champignons, la lumière est apte à provoquer des phénomènes de mouvement dans différentes directions, et comment elle exerce une action régulatrice sur l'éjection des spores. Chez le Coprinus stercorarius, il fit cette découverte importante que les spores sont renfermées dans une enveloppe et qu'elles ont le caractère d'un sporange. Il a laissé en assez grand nombre des notes relatives aux champignons supérieurs qu'on rencontre aux environs de Copenhague; de même aussi, il a fait, à des naturalistes réunis en congrès en Suède, il y a quelques années, une conférence sur les Agaricinées se trouvant aux environs de Copenhague.

Independamment de son œuvre de naturaliste, Hansen s'adonna encore à d'autres études, notamment à celle des beaux-arts et à l'histoire de l'art. Ses fréquents voyages à l'étranger le conduisirent souvent aux lieux où se trouvent réunis les trésors artistiques; il était heureux d'en profiter pour y alimenter à loisir son amour de l'art; il était aussi un connaisseur approfondi et entendu de tout ce que notre pays possède en fait d'objets d'art. Il s'était formé, petit à petit, une bibliothèque considérable, composée, il est vrai, en majeure partie de livres traitant des sciences naturelles, mais l'histoire de l'art y occupait aussi une belle place. Il a laissé également une importante collection d'eaux-fortes, d'estampes et de dessins. Au cours du temps, il s'était en outre procuré les portraits de naturalistes célèbres qu'il avait fait encadrer, collection qui, avec un grand nombre d'extraits et de livres ayant trait à la physiologie des fermentations ainsi qu'aux sciences s'y rattachant, fut acquise après sa mort par le Laboratoire de Carlsberg. Son intérêt s'étendait aussi à l'histoire militaire et aux biographies de personnages célèbres, et surtout dans les dernières années il s'était procuré pas mal de livres s'y rapportant. Il avait recueilli lui-même des matériaux considérables pour la biographie de Otto Friederich Müller, qu'il considérait comme le plus grand naturaliste dont puisse s'honorer le Danemark, et dans sa jeunesse il avait écrit un article sur Niels Stensen (Nicolas Steno) et sur Swammerdam (1). Il avait toujours aimé passionnément les livres, et on ne comprend pas comment, dans ses premières années d'études, avec ses faibles ressources, il ait pu acquérir autant d'ouvrages coûteux.

Dans toutes les circonstances de la vie, Hansen était toujours l'homme de science; il envisageait même les évènements journaliers les plus simples avec un sérieux tout scientifique, ce qui, joint à l'étrange lourdeur qui le caractérisait, tant au physique qu'au moral, se manifestait également p. ex. par le fait qu'il ne savait pas goûter un trait d'esprit, mais prenait tout au plus grand sérieux. Ce sérieux de savant était, pour ainsi dire, toujours repandu sur sa personne; mais il n'était en réalité qu'une écorce recouvrant son être proprement dit. Il est probable que

c'est lorsqu'il pensait pouvoir être gai sans rien perdre de sa dignité, qu'il se trouvait le plus à l'aise. Mais, d'après lui, cela ne pouvait pas être d'habitude; cela n'était pas convenable pour un homme de science d'être enjoué, excepté dans des occasions tout à fait extraordinaires. Cependant, avec les années, ces apparences rudes et sévères disparurent en partie, apparences qui provenaient, du reste, en grande partie de la singulière manière de voir qu'il s'était appropriée, à savoir que, sans prendre un air rébarbatif et désagréable, il était impossible de faire convenablement son chemin dans le monde. Un air sévère nous fait respecter, disait-il; il n'y a rien de tel pour intimider les gens. Se mettant d'accord avec cette maxime, il ne louait ordinairement aucun travail, parce que, selon lui, n'ayant pas reçu d'éloges, on se sentirait d'autant plus poussé à faire plus et mieux la fois suivante.

En outre de ce trait caractéristique de sa manière d'être, Hansen avait encore plusieurs autres bizarreries de caractère, comme, p. ex., celle de faire en sorte que personne ne sût le chiffre de sa fortune. Il tenait à se faire passer pour pauvre, et il plaçait ses fonds dans différentes banques et caisses d'épargne, de manière qu'aucune d'elles ne pouvait savoir ce qu'il possédait. C'est ce qui, après sa mort, donna lieu à des malentendus, jusqu'à ce qu'on apprit qu'il laissait une fortune qui pour notre pays était relativement considérable, malgré le fait que, pendant de nombreuses années, il avait sacrifié annuellement d'assez fortes sommes pour venir en aide à diverses personnes. Car Hansen était extrêmement bienfaisant, mais il l'était en silence. Il n'avait jamais oublié sa propre jeunesse et la pauvreté qui avait été son partage, et, mieux que personne, il savait le bien que peut faire un secours bien placé. Aussi, dans son testament, n'a-t-il pas oublié ceux qu'il avait secourus de son vivant, et il a laissé une rente viagère à plusieurs d'entre eux. De plus, par testament, il a affecté une grande partie de sa fortune — (env. 50000 couronnes) à une fondation qui doit porter son nom et dont les intérêts devront servir à récompenser des travaux biologiques qui en auront été jugés dignes par un Comité inter-

national. Il a également établi des legs en faveur des pauvres de Ribe, sa ville natale, et de ceux de Valby.

Les amertumes qui avaient abreuvé sa jeunesse avaient laissé une certaine aigreur dans le caractère de Hansen, ce qui souvent le portait à voir les choses plus en noir que de raison. C'est pourquoi il vit souvent des attaques personnelles là où, probablement, on n'en avait même pas eu l'idée. Il était très ambitieux et aimait beaucoup les honneurs et les titres honorifiques; aussi se réjouissait-il sincèrement des marques d'honneur qu'on lui prodigua pendant la dernière partie de sa vie. Car lui personnellement pensait que, durant toute sa carrière, il avait mené une vie trop retirée, qu'il n'avait pas assez fréquenté le monde, ce qui l'avait privé de grands avantages; bref, il avait été par trop «solitaire», disait-il. Et il ajoutait: «J'ai toujours eu ce défaut, et, en cela, il ne faut pas m'imiter; on n'y trouve pas son compte». — Même a l'heure de la mort, il fut solitaire: il rendit le dernier soupir dans un sanatorium du petit village de Hornbæk, loin de son épouse et de son fils, entouré seulement de personnes qu'il ne connaissait pas.

C'est au Cimetière de l'Ouest de Copenhague qu'il a trouvé sa dernière demeure, dans ce site solitaire où, dans le courant des années, il avait passé tant d'heures, lors de ses promenades, à observer la fleuraison de nos premières plantes au printemps, la flore de champignons de l'automne, les nombreux oiseaux qui ont leurs retraites là-bas, bref, tout ce qui peut intéresser un véritable ami de la nature. Il repose maintenant aux côtés de sa femme, qui, un mois après lui, descendit dans la tombe.

En écrivant cette biographie, je me suis efforcé de suivre un des nombreux bons conseils que, maintes fois, Hansen m'avait recommandé de suivre, à savoir celui-ci: «Quand on fait une biographie, il faut s'abstenir de ces paroles vaines, enthousiastes, élogieuses qui ne disent rien, éviter de porter cette personne aux nues. Seules ses œuvres doivent parler. Il faut parler de

ses travaux, pour en faire ressortir l'importance, et de son caractère pour faire connaître l'homme. Ceux qui savent juger, sauront alors tirer des conclusions justes».

Aussi, ayant suivi, dans cet essai, la ligne de conduite indiquée par mon vieux et vénéré maître, j'espère avoir réussi a parler de lui dans l'esprit qui, selon lui, est le bon, et à montrer sa grandeur comme homme et comme savant.

TABLE CHRONOLOGIQUE DES PUBLICATIONS D'EMIL CHR. HANSEN

1871

1. To berømte Naturforskere.
   [Deux naturalistes célèbres].
   (Hist. Archiv, Bd. I, 1871).

1873

2. En foreløbig Beretning om Moseundersøgelser i Eftersommeren 1873.
   [Rapport préliminaire sur des recherches de marais faites vers la fin de l'été 1873].
   (Vidensk. Medd. fra den naturh. For. i Kjbhvn. 1873).

1874

3. Om Gjærsvampe.
   [Sur les levures].
   (Tidsskr. f. pop. Fremst. af Naturv., 5. R., Bd. I, 1874).

1876

4. De danske Gjødningssvampe.
   [Fungi fimicoli Danici].
   (Vidensk. Medd. fra den naturh. For. i Kjbhvn. 1876).
   Résumé en français:
   Les Champignons stercoraires du Danemark. *(ibid.)*.
5. Peziza Ripensis E. Chr. Hans. Species nova, quae a sclerotio gignitur.
   (Hedwigia, Bd. XV, 1876).

1877

6. Om Blodlegemers Tælling.
   [Sur la numération des globules du sang].
   (Tidsskr. f. pop. Fremst. af Naturv. 5. R., Bd. IV, 1877).

1878

7. Mærkelige Gjødningssvampe.
   [Des espèces remarquables de champignons stercoraires].
   (Tidsskr. f. pop. Fremst. af Naturv. 5. R., Bd. V, 1878).

8. Culturplanternes Ernæring. Populært fremstillet af Ad. Mayer. Paa Dansk ved Emil Chr. Hansen. Kjøbenhavn 1878.
[La nutrition des végétaux cultivés. Aperçu populaire par Ad. Mayer, traduit en danois par Emil Chr. Hansen. Copenhague 1878].

1879

9. Organismer i Øl og Ølurt. Botaniske Undersøgelser. Med 2 Kobbertavler. Kjøbenhavn 1879.
[Les organismes vivant dans la bière et le moût de bière. Recherches d'ordre botanique. Avec 2 gravures en taille-douce. Copenhague 1879].
10. Bidrag til Kundskab om hvilke Organismer der kunne forekomme i Øl og Ølurt. (Medd. fra Carlsb. Lab., Bd. I, Hefte 2, 1879).
Résumé en français:
Contributions à la connaissance des organismes qui peuvent se trouver dans la bière et le moût de bière et y vivre.
(Compt. rend. des trav. du Laborat. de Carlsberg, vol. I, livr. 2, 1879).

1880

11. Ueber Saccharomyces apiculatus.
Hedwigia. Bd. XIX. 1880.

1881

12. Undersøgelser over Alkoholgjærsvampenes Fysiologi og Morfologi.
I. Om Saccharomyces apiculatus og dens Kredsløb i den frie Natur.
(Medd. fra Carlsb. Lab., Bd. I, Hefte 3, 1881).
Résumé en français:
Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques.
I. Sur le Saccharomyces apiculatus et sa circulation dans la nature.
(Compt. rend. des trav. du Laborat. de Carlsberg, vol. I, livr. 3, 1881).
13. Et fugtigt Kammer til Dyrkning af Mikroorganismer.
(Medd. fra Carlsb. Lab., Bd. I, Hefte 3, 1881).
Résumé en français:
Chambre humide pour la culture des organismes microscopiques.
(Compt. rend. des trav. du Laborat. de Carlsberg, vol. I, livr. 3, 1881).

1882

14. Undersøgelser over de Organismer, som til forskjellige Tider af Aaret findes i Luften i og omkring Carlsberg, og som kunne udvikle sig i Ølurt. (Anden Meddelelse).
(Medd. fra Carlsb. Lab., Bd. I, Hefte 4, 1882).
Résumé en français:
Recherches sur les organismes qui, à différentes époques de l'année, se trouvent dans l'air, à Carlsberg et aux alentours, et qui peuvent se développer dans le moût de bière. (Deuxième communication).
(Compt. rend. des trav. du Laborat. de Carlsberg, vol. I, livr. 4, 1882).
15. Den nyere Tids Undersøgelser over Luftens mikroskopiske Organismer.
[Recherches récentes sur les organismes microscopiques de l'air].
(Tidsskr. f. pop. Fremst. af Naturv., Bd. XXIX, 1882).

1883

16. Undersøgelser over Alkoholgjærsvampenes Fysiologi og Morfologi.
II. Om Askosporedannelsen hos Slægten Saccharomyces.
III. Om Pasteurs Torula.
IV. Sygdomme i Øl, fremkaldte af Alkoholgjærsvampe.
(Medd. fra Carlsb. Lab., Bd. II, Hefte 2, 1883).
Résumé en français:
Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques.
II. Les ascospores chez le genre Saccharomyces.
III. Sur les Torulas de M. Pasteur.
IV. Maladies provoquées dans la bière par des ferments alcooliques.
(Compt. rend. des trav. du Laborat. de Carlsberg, vol. II, livr. 2, 1883).
17. Bidrag til Alkoholgjærsvampenes Fysiologi. Et fugtigt Kammer til Dyrkning af Mikroorganismer.
[Foredrag ved Naturforskermødet i Stockholm 1880].
[Contribution à la physiologie des ferments alcooliques.
Chambre humide pour la culture des microorganismes.
Conférence faite au Congrès de naturalistes à Stockholm en 1880].
(Förhandlingar vid de skandinaviska Naturforskarnes tolfte möte i Stockholm den 7 till den 14 juli 1880. — Stockholm 1883).
18. Bemerkungen über Hefenpilze.
(Allg. Zeitschr. f. Bierbr. u. Malzf., 1883).

1884

19. Untersuchungen aus der Praxis der Gährungsindustrie.
(Zeitschr. f. das ges. Brauw., Bd. VII, 1884).
20. Neue Untersuchungen über Alkoholgährungspilze.
(Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., Bd. II, 1884).
21. Ueber neue Untersuchungen der Alkoholgährungspilze.
(Tagebl. d. 57. Vers. deutsch. Naturf. u. Aerzte in Magdeburg, 1884).
22. Ueber das Zählen mikroskopischer Gegenstände in der Botanik.
(Zeitschr. f. wissensch. Mikroskopie und f. mikroskop. Technik, Bd. I, 1884).
23. Ueber Wiesner's neue Prüfungsmethode der Presshefe.
(Dingler's polytechn. Journ., Bd. CCLII, 1884).

1885

24. Om Renkulturer af Mikroorganismer. Bemærkninger i Anledning af D:r Salomonsens »Ledetråd for Medicinere i bakteriologisk Teknik«.
[Sur les cultures pures de microorganismes. Remarques sur le Précis de technique bactériologique à l'usage des étudiants en médecine, par le Dr Salomonsen].
(Nord. medic. Arkiv, Bd. XVII, 1885).
25. Einige kritische Bemerkungen über Dr. Hueppe's Buch, »Die Methoden der Bacterien-Forschung«.
(Zeitschr. f. wissensch. Mikroskopie und f. mikrosk. Technik, Bd. II, 1885).
26. Vorläufige Mittheilungen über Gährungspilze.
(Bot. Centralbl., Bd. XXI, 1885).

1886

27. Undersøgelser over Alkoholgjærsvampenes Fysiologi og Morfologi.
V. Methoder til Fremstilling af Renkulturer af Saccharomyceter og lignende Mikroorganismer.
VI. Om Hindedannelsen hos Slægten Saccharomyces.
Medd. fra Carlsb. Lab., Bd. II, Hefte 4, 1886).
Résumé en français:
Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques.
V. Méthodes pour obtenir des cultures pures de Saccharomyces et de microorganismes analogues.
VI. Les voiles chez le genre Saccharomyces.
(Compt. rend. des trav. du Laborat. de Carlsberg, vol. II, livr. 4, 1886).
28. Om Analyser af Luftens Mikroorganismer.
[Foredrag i Selskabet for Sundhedsplejen 4de Marts 1886].
[Sur les analyses des microorganismes de l'air.
Conférence faite, le 4 mars 1886, à l'Association pour l'hygiène].
(Hygiejniske Medd., 3. R., Bd. III, 1886).

1887

29. Ueber Hefe und Hefereinzucht. Vortrag in der Generalversammlung des Oesterreichischen Brauerbundes am 12. Juni 1887 in Graz.
(Allg. Zeitschr. f. Bierbr. u. Malzf., Bd. XVI, 1887).
30. Ueber roth- und schwarzgefärbte Sprosspilze.
(Allg. Brauer- und Hopfenztg., 1887).
31. Neue Bemerkungen zu Foths Abhandlung »Einfluss der Kohlensäure auf Gährung und Hefebildung«.
(Wochenschr. f. Brauerei, Bd. IV, 1887).
32. Noch ein Wort über den Einfluss der Kohlensäure auf Gährung und Hefebildung.
(Zeitschr. f. das ges. Brauw., Bd. X, 1887).
33. Methode til Analyse af Bryggerivandet med Hensyn til Mikroorganismer.
[Méthode pour l'analyse de l'eau de brasserie relativement aux microorganismes y contenus].
(Zymotechn. Tidsskr., Bd. III, 1887).
En allemand dans la Zeitschr. f. das ges. Brauw., Bd. XI, 1888; toutefois, dans cette traduction, quelques additions faites à l'original précité font défaut.

1888

34. Om den zymotechniske Analyse af Luftens Mikroorganismer.
[Sur l'analyse zymotechnique des microorganismes de l'air].
(Zymotechn. Tidsskr., Bd. IV, 1888).
35. Über die zymotechnische Analyse der Microorganismen in der Luft.
(Prager Brauer- u. Hopfenztg., 1888).
Dans ce mémoire le sujet de celui cité en 34 est traité avec plus de détails.
36. Die Theorie und Praxis der Malzbereitung und Bierfabrikation. Efter egne Erfaringer af Julius E. Thausing.
[Compte rendu de l'ouvrage de M. Thausing dans le Zymotechn. Tidsskr., Bd. IV, 1888].
37. Methode zur Analyse des Brauwassers in Rücksicht auf Mikroorganismen.
(Zeitschr. f. das ges. Brauw., Bd. XI, 1888).
(Voir le mémoire danois dans le Zymotechn. Tidsskr., Bd. III, 1887).

38. Undersøgelser over Alkoholgjærsvampenes Fysiologi og Morfologi.
VII. Om Alkoholgjærsvampenes Forhold til Sukkerarterne.
(Medd. fra Carlsb. Lab., Bd. II, Hefte 5, 1888).
Résumé en français:
Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques.
VII. Action des ferments alcooliques sur les diverses espèces de sucre.
(Compt. rend. des trav. du Laborat. de Carlsberg, vol. II, livr. 5, 1888).
39. Undersøgelser fra Gjæringsindustriens Praxis. I—IV.
(Medd. fra Carlsb. Lab., Bd. II, Hefte 5, 1888).
Résumé en français:
Recherches faites dans la pratique de l'industrie de la fermentation. I—IV.
(Compt. rend. des trav. du Laborat. de Carlsberg, vol. II, livr. 5, 1888).
40. Untersuchungen aus der Praxis der Gärungsindustrie. 1. Heft. München und Leipzig 1888.
Se trouve aussi dans la »Zeitschr. f. d. ges. Brauw.«, Bd. XI, 1888.
2. Auflage 1890.
3. Auflage 1895.

1889

41. Über die in dem Schleimfluss lebender Bäume beobachteten Microorganismen.
(Centralbl. f. Bakt. u. Par., Bd. V, 1889).
42. Nogle Optegnelser fra et Besøg i Bryggerierne i Burton on Trent og i London.
[Quelques notes prises lors d'une visite aux brasseries de Burton et de Londres].
(Zymotechn. Tidsskr., Bd. V, 1889).
43. Some points in connexion with practical brewing.
(Transactions of the Laboratory Club 1889).

1890

44. Sur la production de variétés chez les Saccharomyces.
(Ann. de micrographie, vol. II, 1889—90).
En danois dans Zymotechn. Tidsskr., Bd. VI, 1890.
45. Über die Pilzstudien in der Zymotechnik. Mit besonderer Rücksicht auf Prof. Dr. Zopfs neues Werk: »Die Pilze in morphologischer, physiologischer, biologischer und systematischer Beziehung«. Breslau 1890.
(Zeitschr. f. das ges. Brauw., Bd. XIII, 1890).
En danois dans Zymotechn. Tidsskr., Bd. VI, 1890.
46. Nouvelles recherches sur la circulation du Saccharomyces apiculatus dans la nature.
(Ann. sci. nat., 7 sér., tome XI, 1890).
En danois dans Zymotechn. Tidsskr., Bd. VI, 1890.
47. Nye biologiske Undersøgelser hos Svampe.
[Nouvelles recherches biologiques sur certains champignons].
(Naturen og Mennesket, Bd. III, 1890).
48. Untersuchungen aus der Praxis der Gärungsindustrie.
1. Heft. 2. Auflage. München und Leipzig 1890.

1891

49. Undersøgelser over Alkoholgjærsvampenes Fysiologi og Morfologi.
VIII. Om Sporernes Spiring hos Saccharomyceterne.
(Medd. fra Carlsb. Lab., Bd. III, Hefte 1, 1891).

Résumé en français:
Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques. VIII. Sur la germination des spores chez les Saccharomyces.
(Compt. rend. des trav. du Laborat. de Carlsberg, vol. III, livr. 1, 1891).

50. Hvad er Pasteurs rene Gjær? En experimental Undersøgelse.
(Medd. fra Carlsb. Lab., Bd. III, Hefte 1, 1891).
Résumé en français:
Qu'est-ce que la levûre pure de M. Pasteur? Une recherche expérimentale.
(Compt. rend. des trav. du Laborat. de Carlsberg, vol. III, livr. 1, 1891).

51. Undersøgelserne over Selvdannelse og de derved vundne Resultater.
[Les recherches sur la génération spontanée et les résultats qu'elles ont donnés].
(Naturen og Mennesket, Bd. V, 1891).
Reproduction plus détaillée d'une conférence faite en octobre 1890 à l'Association d'Histoire naturelle de Copenhague.

52. Über Charactäre rein cultivirter Unterhefearten.
(Der Braumeister, Bd. IV, 1891).

1892

53. Neue Untersuchungen über den Einfluss, welchen eine Behandlung mit Weinsäure auf die Brauereihefe ausübt.
(Zeitschr. f. das ges. Brauw., Bd. XV, 1892).

54. Kritische Untersuchungen über einige von Ludwig und Brefeld beschriebene Oïdium- und Hefenformen.
(Botan. Ztg., Bd. L, 1892).

55. Undersøgelser fra Gjæringsindustriens Praxis. (Bidrag til Mikroorganismernes Livshistorie).
V. Om den gjæringstekniske Analyse af Luftens og Vandets Mikroorganismer.
VI. Nye Undersøgelser over Sygdomme i Øl, fremkaldte af Alkoholgjærsvampe. (Anden Afhandling).
VII. Om den nuværende Udbredelse af mit Gjærrendyrkningssystem.
(Medd. fra Carlsb. Lab., Bd. III, Hefte 2, 1892).
Résumé en français:
Recherches faites dans la pratique de l'industrie de la fermentation. (Contributions à la biologie des microorganismes).
V. Sur l'analyse zymotechnique des microorganismes de l'air et de l'eau.
VI. Nouvelles recherches sur les maladies provoquées dans la bière par des ferments alcooliques. (Deuxième mémoire).
VII. Sur l'extension actuelle de mon système de culture pure de la levure.
(Compt. rend. des trav. du Laborat. de Carlsberg, vol. III, livr. 2, 1892).

56. Untersuchungen aus der Praxis der Gärungsindustrie. 2. Heft. München und Leipzig 1892.

57. Untersuchungen über Krankheiten im Biere, durch Alkoholgährungspilze hervorgerufen.
(Zeitschr. f. das ges. Brauw., Bd. XV, 1892).
Ce mémoire, qui fait partie du volume cité en 56, a été imprimé à part avant l'apparition de ce dernier.

1893

58. Ueber die neuen Versuche, das Genus Saccharomyces zu streichen.
(Centralbl. f. Bakt. u. Par., Bd. XIII, 1893).

59. Die Variation und Anpassungsfähigkeit der Saccharomyceten.
(Bot. Centralbl., Bd. LIII, 1893).

60. Botanische Untersuchungen über Essigsäurebacterien.
(Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., Bd. XI, 1893).
En danois dans Zymotechn. Tidsskr., Bd. X, 1894.
61. Recherches botaniques sur les bactéries acétifiantes.
(Bull. de l'Acad. Royale des Sc. et des Lettres de Danemark pour l'année 1893).
62. Nye gjæringstekniske Haand- og Lærebøger.
[Sur quelques nouveaux traités de technologie de fermentation].
(Zymotechn. Tidsskr., Bd. IX, 1893).

1894

63. Undersøgelser over Eddikesyrebakterier. (Anden Afhandling).
(Medd. fra Carlsb. Lab., Bd. III, Hefte 3, 1894).
Résumé en français:
Recherches sur les bactéries acétifiantes. (Second mémoire).
(Compt. rend. des trav. du Laborat. de Carlsberg, vol. III, livr. 3, 1894).
64. Zur Errichtung einer Hefe-Reinzucht-Station für Weinbereitung in Geisenheim a. Rh.
(Weinbau und Weinhandel, Jahrg. XII, 1894).

1895

65. Anlässlich Juhler's Mitteilung über einen saccharomycesbildenden Aspergillus.
(Centralbl. f. Bakt. u. Par., II. Abt., Bd. I, 1895).
66. Experimental Studies on the Variation of Yeast-cells.
(Annals of Bot., vol. IX, 1895).
67. Über »künstliche« und »natürliche« Hefenreinzucht.
(Zeitschr. f. das ges. Brauw., Bd. XVIII, 1895).
68. Untersuchungen aus der Praxis der Gärungsindustrie. 1. Heft. 3. Auflage. München und Leipzig. 1895.

1896

69. Practical Studies in Fermentation: being Contributions to the Life History of Microorganisms. Translated by Alex. K. Miller and revised by the author. London and New York. 1896.

1897

70. Om Virksomheden i Carlsberg Fondets fysiologiske Laboratorium i de senere Aar.
[Sur les travaux faits pendant ces dernières années dans le laboratoire physiologique de la Fondation Carlsberg].
(Forh. paa det tredie danske Bryggerimøde i Kjøbenhavn 1896).
[Transactions de la troisième Réunion des Brasseurs Danois à Copenhague 1896].
71. Biologische Untersuchungen über Mist bewohnende Pilze. (Die sclerotienbildenden Coprini, Anixiopsis stercoraria).
(Botan. Ztg., Bd. LV, 1897).
72. Om variationen hos öljästsvamparne och hos andra Saccharomyceter. Föredraget vid Allmänna Sjätte Svenska Bryggaremötet 1897.
[La variation des levures de bière et autres Saccharomycètes. Conférence faite à la Sixième Réunion Générale des Brasseurs Suédois, 1897].
(Svenska Bryggareföreningens Månadsblad 1897).
En allemand dans la »Zeitschr. f. das ges. Brauw.«, Bd. XXI, 1898.
73. Nogle Undersøgelser over Agaricineernes Biologi.
[Quelques recherches sur la biologie des Agaricinées].
[Conférence faite à la Société Biologique le 28 octobre 1897].
(Hospitalstidende, Bd. XL, 1897).

74. Biologiske Undersøgelser over de sclerotiedannende Copriner.
[Recherches biologiques sur les Coprines formant des scléroties].
(Overs. over det kgl. Danske Vid. Selsk. Forh. 1897).

1898

75. Undersøgelser over Alkoholgjærsvampenes Fysiologi og Morfologi.
IX. Om Alkoholgjærsvampenes Livsgrændse og Variation i Næringssubstrater og i indtørret Tilstand.
(Medd. fra Carlsb. Lab., Bd. IV, Hefte 3, 1898).
En français:
Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques.
IX. Sur la vitalité des ferments alcooliques et leur variation dans les milieux nutritifs et à l'état sec.
(Compt. rend. des trav. du Laborat. de Carlsberg, vol. IV, livr. 3, 1898).

1899

76. Studier over Agaricineer i Kjøbenhavns Omegn.
[Autor-Referat af Foredrag paa Naturforskermødet i Stockholm 1898].
Etude sur les Agaricinées des environs de Copenhague.
Résumé authentique d'une conférence faite au Congrès de naturalistes à Stockholm 1898].
(Förhandlingar vid det 15de skandinaviska Naturforskaremötet i Stockholm den 7—12 Juli 1898).
77. Neue Untersuchungen über die Sporenbildung bei den Saccharomyceten.
(Centralbl. f. Bakt., Par. u. Inf., II. Abt., Bd. V, 1899).

1900

78. Undersøgelser over Eddikesyrebakterier. (Tredie Afhandling).
(Medd. fra Carlsb. Lab., Bd. V, Hefte 1, 1900).
En français:
Recherches sur les bactéries acétifiantes. (Troisième mémoire).
(Compt. rend. des trav. du Laborat. de Carlsberg, vol. V, livr. 1, 1900).
79. Undersøgelser over Alkoholgjærsvampenes Fysiologi og Morfologi.
X. Om Variationen hos Saccharomyceterne.
(Medd. fra Carlsb. Lab., Bd. V, Hefte 1, 1900).
En français:
Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques.
X. La variation des Saccharomyces.
(Compt. rend. des trav. du Laborat. de Carlsberg, vol. V, livr. 1, 1900).
80. Some remarks on the discussion in connection with Jörgensen's »Biological studies on English yeast-types, with particular regard to their practical use«.
(Journ. of the Fed. Instit. of Brewing, vol. VI, 1900).

1901

81. J. C. Jacobsen, a word of commemoration on the twenty-fifth anniversary of the Carlsberg Fund. Chicago 1901.
Read on the Tenth Anniversary Reunion of the Alumni of the American Brewing Academy, Chicago.
En allemand:
J. C. Jacobsen, ein Wort der Erinnerung anlässlich des 25-jährigen Jubiläums des Carlsberg-Fonds. Chicago 1901.
[Se trouve dans la brochure publiée au sujet du jubilé et dans la American Brewer's Review; en danois, dans le Dansk Bryggeritidende, 1902, Nr. 1].

82. Aus der Hefenforschung der neuesten Zeit.
Vortrag, gehalten am 23. Juni 1901 in Braunschweig auf der VI. Generalversammlung des Deutschen Braumeister- und Malzmeister-Bundes.
(Wochenschr. f. Brauerei, Bd. XVIII, 1901).

1902

83. Undersøgelser over Alkoholgjærsvampenes Fysiologi og Morfologi.
XI. Saccharomyces-Sporen som Sporangium.
XII. En sammenlignende Undersøgelse over Betingelserne for den vegetative Vækst og Forplantningsorganernes Udvikling hos Alkoholgjærsvampene.
(Medd. fra Carlsb. Lab., Bd. V, Hefte 2, 1902).
En francais:
Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques.
XI. La spore de Saccharomyces devenue sporange.
XII. Recherches comparatives sur les conditions de la croissance végétative et le développement des organes de reproduction des levures et des moisissures de la fermentation alcoolique.
(Compt. rend. des trav. du Laborat. de Carlsberg, vol. V, livr. 2, 1902).
84. Nye Undersøgelser over Gærarternes Kredsløb i Naturen.
[Nouvelles recherches sur la circulation des levures dans la nature].
(Overs. over det kgl. Danske Vid. Selsk. Forh. 1902).
85. Einige meiner neuen Hefenstudien. Vortrag an der 20. ordentlichen Generalversammlung des Vereins Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin.
(Wochenschr. f. Brauerei, Bd. XIX, 1902, et Jahrbuch der Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin, Bd. V, 1902. — Berlin 1903).

1903

86. Neue Untersuchungen über den Kreislauf der Hefenarten in der Natur.
(Centralbl. f. Bakt., Par. u. Inf., II. Abt., Bd. X, 1903).
87. Om Haverne i Nord-Italien.
[Sur les jardins de l'Italie du Nord].
(Haven, Aarg. 3, 1903).

1904

88. Grundlinien zur Systematik der Saccharomyceten.
(Centralbl. f. Bakt., Par. u. Inf., II. Abt., Bd. XII, 1904).

1905

89. Ueber die Brutstätten der Alkoholgärungspilze oberhalb der Erde.
(Centralbl. f. Bakt., Par. u. Inf., II. Abt., Bd. XIV, 1905).
En danois dans le Bryggeritidende, Bd. VIII, 1905.
90. Oberhefe und Unterhefe. Studien über Variation und Erblichkeit.
(Centralbl. f. Bakt., Par. u. Inf., II. Abt., Bd. XV, 1905.
En danois dans le Bryggeritidende, Bd. VIII, 1905.
91. Considerations on Technical Mycology. (A lecture delivered at the opening of the Department for Technical Mycology at the Heriot Watt College, Edinburgh, October 18th, 1905).
(Journ. of the Instit. of Brewing, vol. XI, 1905).

1906

92. Erhard Kogsbølle. Et Bidrag til den danske Ølindustris Historie.
[Erhard Kogsbølle. Contribution à l'histoire de l'industrie brassicole de Danemark].
(Bryggeritidende, Bd. IX, 1906).

1907

93. Oberhefe und Unterhefe. Studien über Variation und Erblichkeit. Zweite Mitteilung.
(Centralbl. f. Bakt., Par. u. Inf., II. Abt., Bd. XVIII, 1907).
Résumé en danois dans le Bryggeritidende, Bd. X, 1907.

94. Ueber die tötende Wirkung des Aethylalkohols auf Bakterien und Hefen.
(Centralbl. f. Bakt., Par. u. Inf., I. Abt., Originale, Bd. XLV, 1907).

1908

95. Undersøgelser over Alkoholgærsvampenes Fysiologi og Morfologi.
XIII. Nye Studier over Bryggeri-Undergærarter.
(Medd. fra Carlsb. Lab., Bd. VII, Hefte 3, 1908).
En français
Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques.
XIII. Nouvelles études sur des levures de brasserie à fermentation basse.
(Compt. rend. des trav. du Laborat. de Carlsberg, vol. VII, livr. 3, 1908).

1909

96. Lidt om min Forskning paa Carlsberg Laboratorium.
[Notes relatives à mes travaux faits dans le Laboratoire de Carlsberg].
(»Frem«s Aarbog 1909).

1873

Traduction anonyme en danois[1]):

97. Om Bakterierne, de mindste levende Skabninger, og deres Betydning i Naturen og Menneskelivet. (Af Prof., Dr. Ferd. Cohn i Breslau).
[Sur les bactéries, êtres vivants infiniment petits, et sur leur importance dans la nature et au point de vue de l'homme. Par le Prof. et Dr Ferd. Cohn, à Breslau .
(Tidsskr. f. pop. Fremst. af Naturv., 4. R., Bd. V, 1873).

1876

Avec la collaboration de M. A. Jørgensen, la traduction suivante:

98. Charles Darwins Rejse om Jorden. Paa Dansk ved Emil Chr. Hansen og Alfred Jørgensen. Kjøbenhavn 1876.
[Le voyage de Charles Darwin autour de la terre. Traduit en danois par Emil Chr. Hansen et Alfred Jørgensen. Copenhague 1876].

1889

Ecrit polémique publié en collaboration de van der Aa Kühle:

99. Déclaration au sujet de la Conférence de M. Eugène Velten, Brasseur de Marseille, au Congrès des Brasseurs Belges à Anvers 1889.
Cette déclaration a été envoyée à un certain nombre de personnes et d'institutions. La Wochenschr. f. Brauerei en a publié une traduction dans son vol. VI, 1889.

En outre, Hansen a coopéré à plusieurs ouvrages d'exsiccats, entre autres, aux Fungi europ. exsicc. par Rabenhorst.

[1]) D'après E. Warming: Den danske botaniske Literatur fra de ældste Tider til 1880. (Bot. Tidsskr., Bd. XII, 1881).

TABLE
DES CONFÉRENCES FAITES PAR EMIL CHR. HANSEN

1873

En foreløbig Beretning om Moseundersøgelser i Eftersommeren 1873.
[Rapport préliminaire sur des recherches de marais faites vers la fin de l'été 1873.
(Association d'Histoire naturelle de Copenhague). (2).

1880

Bidrag til Alkoholgærsvampenes Fysiologi. — Et fugtigt Kammer til Dyrkning af Mikroorganismer.
Contribution à la physiologie des ferments alcooliques. — Chambre humide pour la culture des organismes microscopiques].
Congrès de naturalistes à Stockholm). (17).

1884

Ueber neue Untersuchungen der Alkoholgährungspilze.
[Nouvelles recherches sur les ferments alcooliques].
(Congrès de naturalistes à Magdebourg). (21).

1886

Om Alkoholgærsvampenes Forhold til Sukkerarterne. — Om Anvendelsen af rendyrkede Gærracer i Industrien.
[Action des ferments alcooliques sur les diverses espèces de sucre. — Application industrielle de levures cultivées à l'état de pureté].
(Congrès de naturalistes à Christiania).
Om Analyser af Luftens Mikroorganismer.
[Sur les analyses des microorganismes de l'air].
(Association pour l'hygiène à Copenhague). (28).

1887

Om Gær og Gærrendyrkning.
[Sur la levure et sa culture pure].
(Assemblée générale de l'Oesterreichischer Brauerbund à Gratz). (29).

1889

Nogle Punkter i Forbindelse med praktisk Brygning.
[Quelques points relatifs à la fabrication de la bière].
(The Laboratory Club à Londres). (43).

1890

Undersøgelserne over Selvdannelse og de derved vundne Resultater.
[Les recherches sur la génération spontanée et les résultats qu'elles ont donnés].
(Association d'Histoire naturelle de Copenhague). (51).

1892

Om Adaption hos Saccharomyceter.
[Adaptation des Saccharomycètes].
(Congrès de naturalistes à Copenhague).

1893

Om Eddikesyrebakterier.
[Sur les bactéries acétifiantes].
(Congrès de naturalistes à Nuremberg). (60).
Om Eddikesyrebakterier.
[Sur les bactéries acétifiantes].
(Académie Royale des Sciences et des Lettres, à Copenhague). (61).

1895

Om Gærcellernes Variation.
[Sur la variation des cellules de levure].
(Réunion de la British Association à Ipswich). (66).

1896

Om Virksomheden i Carlsberg Fondets fysiologiske Laboratorium i de senere Aar.
[Sur les travaux faits pendant ces dernières années dans le laboratoire physiologique de la Fondation Carlsberg].
(Troisième Réunion des Brasseurs Danois à Copenhague 1896). (70).

1897

[Om Variationen hos Ølgærsvampene og hos andre Saccharomyceter].
[La variation des levures de bière et autres Saccharomycètes].
(On a fait la lecture de ce mémoire à la Sixième Réunion Générale des Brasseurs Suédois). (72).
Nogle Undersøgelser over Agaricineernes Biologi.
[Quelques recherches sur la biologie des Agaricinées].
(Société biologique de Copenhague). (73).
Biologiske Undersøgelser over de sclerotiedannende Copriner.
[Recherches biologiques sur les Coprines formant des scléroties].
(Académie Royale des Sciences et des Lettres, à Copenhague). (74).

1898

Studier over Agaricineer i Kjøbenhavns Omegn.
[Etude sur les Agaricinées des environs de Copenhague].
(Congrès de naturalistes à Stockholm). (76).

1901

Af den nyeste Tids Gærforskning.
[Recherches récentes concernant la levure].
(Assemblée générale de Deutscher Braumeister- und Malzmeister-Bund à Brunswick). (82).

1902

Nye Undersøgelser over Gærarternes Kredsløb i Naturen.
[Nouvelles recherches sur la circulation des levures dans la nature].
(Société Royale des Sciences et des Lettres, à Copenhague). (84).
[Nogle af mine nye Gærundersøgelser].
[Quelques-unes de mes recherches récentes sur la levure].
(Conférence dont on a fait la lecture à l'Assemblée générale de la Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei à Berlin). (85).

1905

Betragtninger over teknisk Mykologi.

[Réflexions sur la mycologie technique].

(Conférence faite lors de l'inauguration du service de mycologie technique du Heriot Watt College à Edimbourg]. (91).

TITRES HONORIFIQUES ET AUTRES MARQUES D'HONNEUR DÉFÉRÉES A EMIL CHR. HANSEN

1886

A la demande de Pasteur, la médaille d'or de «La Société d'encouragment pour l'industrie nationale» à Paris.

Membre honoraire de l'Association des Brasseurs Suédois.

1887

Membre honoraire de la «Wissenschaftliche Station für Brauerei» de Munich.

Membre de l'Académie César-Léopold à Halle.

1888

Membre honoraire du «Laboratory Club» à Londres.

Membre honoraire du «Brauindustrie Verein für das Königreich Böhmen» à Prague.

Membre de la «Botanical Society of Edinburgh».

1889

Chevalier de l'Ordre du Danebrog.

Membre honoraire de la «Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei» de Berlin.

1890

Membre honoraire de l'«Association Scientifique des Anciens Elèves de l'Ecole Professionnelle et de l'Institut Supérieur de Brasserie de Gand«.

Membre de l'Académie Royale des Sciences et des Lettres de Danemark.

1891

Membre honoraire du «North of England Institute of Technical Brewing».

1892

Professeur honoraire.

Chevalier de l'Ordre de la Couronne (d'Italie).

Membre de la Société Scientifique de Christiania.

1893

Membre honoraire du «Yorkshire Institute of Brewing» à Leeds.

Membre honoraire de «La Société pour l'Industrie chimique au royaume de Bohême» à Prague.

1894

Chevalier de l'Ordre de Saint-Olaüs (de Norvège).

1895

Sociétaire de la «Reale Società Italiana d'Igiene».

Membre de l'Académie Royale d'Agriculture de Suède à Stockholm.

1897

Membre honoraire de «Der Deutsche Weinbau Verein».

1898

Membre de la Société Royale des Sciences et des Lettres à Upsal.

1899

Membre de «The Linnean Society» de Londres.

1901

Membre honoraire de la «Deutsche Botanische Gesellschaft» de Berlin.

1902

Médaille d'or à l'occasion de son jubilé de vingt-cinq ans, en suite d'une souscription internationale.

Membre honoraire de «Deutscher Brauerbund».

La grande médaille d'or de la «Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei» de Berlin.

1903

Membre de la Société Physiographique Royale de Lund.

Membre honoraire de l'Académie Impériale et Royale François-Joseph à Prague.

1904

Membre honoraire de l'Association des Brasseurs de Finlande à Helsingfors.

1905

Membre honoraire de la «Society for the Encouragement of Arts, Manufactures and Commerce» de Londres.

1907

Docteur honoraire en médecine à l'Université d'Upsal.

Un grand industriel d'Ecosse institue une médaille Hansen, qui sera remise tous les ans aux deux meilleurs élèves du département de mycologie technique de l'Ecole polytechnique (Heriot Watt College) d'Edimbourg.

1908

Commandeur de l'Ordre du Danebrog.

Docteur honoraire en sciences techniques à l'Ecole Technique Impériale et Royale de Vienne.

Membre honoraire de «Svenska Läkaresällskapet» [Association des médecins de Suède].

Pour la seconde fois, la grande médaille d'or de la «Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei» de Berlin.

Membre honoraire de l'Association des Brasseurs de Danemark.

1909

Docteur honoraire à l'Université de Genève.

NOUVELLES RECHERCHES SUR LA CIRCULATION DES LEVURES DANS LA NATURE.

(Centralbl. f. Bakt., Par. u. Infektionsk., 2. Abt., Bd. X, 1903).

PAR

EMIL CHR. HANSEN.

UN de mes premiers travaux au Laboratoire de Carlsberg fut une étude sur les organismes de fermentation qui se rencontrent dans l'air aux différentes époques de l'année. En entreprenant cette étude, j'avais en vue certaines questions pratiques, mais, peu à peu, je fus amené à étudier ces organismes aussi au point de vue théorique. En effet, ayant découvert certains traits généraux dans la manière dont le Saccharomyces apiculatus apparaît dans la poussière de l'air, j'en conçus non seulement l'idée de faire des recherches sur la circulation des levures dans la nature, mais j'appris en même temps où je pouvais trouver l'objet se prêtant le mieux aux expériences que j'allais tenter.

Le Saccharomyces apiculatus est une petite levure alcoolique très répandue dans nos jardins; elle se distingue par sa forme de citron. L'espèce a été établie par Reess; quoiqu'elle ne forme pas de spores, ce savant l'avait classée parmi les Saccharomycètes, étant d'avis que, par une culture continuée, on arriverait à trouver des spores chez elle. Cependant, quelle que fût la manière dont on la cultiva, elle resta asporogène, et ainsi c'est à tort qu'elle porte son nom de Saccharomyces. Mais, si dans le présent mémoire je continue à lui donner ce nom, c'est parce que c'est sous ce nom-là qu'elle est connue dans la littérature.

C'est sur cette espèce que portèrent mes premières observations sur la circulation, observations dont les résultats furent publiés dans les Comptes-rendus du Laboratoire de Carlsberg, **1** (1881). Mes nouvelles recherches comprennent le groupe nom-

breux des véritables Saccharomyces et forment, à plus d'un égard, une série à part.

Avant de passer à la description de ces nouvelles expériences, il sera utile de passer en revue les résultats acquis par ma première série d'observations.

Mes recherches sur le Sacch. apiculatus avaient montré non seulement que cet organisme se trouve sur des fruits doux et juteux arrivés à maturité, mais elles donnaient aussi ce renseignement plus important, à savoir que ces fruits sont le lieu même où il se développe normalement. Au fur et à mesure que leur nombre augmente, il se produit de nombreuses générations des cellules de ce champignon, et, en même temps, elles se trouvent aussi plus abondantes dans les poussières de l'air. Le Sacch. apiculatus s'observe régulièrement d'abord sur les fruits doux et juteux qui mûrissent les premiers, ensuite sur ceux qui arrivent plus tard à maturité. C'est ainsi qu'au jardin de Carlsberg, la saison commence avec les fraises, les groseilles à maquereau et les cerises, et elle finit avec les prunes et les raisins. La pluie et les fruits tombés portent le petit champignon à terre. Or, comme il ne peut de lui-même quitter le sol, il doit nécessairement y être aidé par quelque agent extérieur, et c'est pourquoi il reste à terre, jusqu'à ce que le vent en soulevant la poussière vienne le faire tournoyer dans les airs avec elle, ou que la pluie le lance sur des plantes, telles que, par ex., les fraisiers; de même aussi les insectes et d'autres animalcules contribuent à transporter ce champignon. Et alors, s'il arrive ainsi projeté à quelque endroit où il trouve de la nourriture, il commence à bourgeonner; sinon, il se dessèche et périt. Le transport direct du jus d'un fruit à celui d'un autre se fait par les insectes et les oiseaux; les guêpes surtout s'y emploient particulièrement. Tout cela se répète plusieurs fois dans le courant de l'été, de sorte que tantôt notre champignon est porté des fruits sur le sol, et tantôt du sol aux endroits où il accomplit son développement. Il passe l'hiver dans la terre pour recommencer la même circulation l'été suivant; ainsi, la terre est normalement l'endroit où il séjourne pendant l'hiver.

La question se pose maintenant de savoir si la circulation que j'avais ainsi constatée chez le Sacch. apiculatus se retrouve

chez les Saccharomycètes proprement dits. En effet, le phénomène que je viens de résumer, est si simple et si évident, qu'il va de soi, pour ainsi dire, qu'il doit être commun aux levures en général. Aussi n'étais-je pas le seul à admettre cette manière de voir, mais plusieurs de mes collègues la partageaient. Pasteur, par contre, y était opposé, parce que, selon lui, la terre n'est pas le séjour d'hiver des levures de vin. Mais, quant à dire où elles le passaient, il n'en a rien fait. D'après Brefeld, les cellules de levure non seulement se multiplient dans le canal digestif des animaux, mais leurs principaux lieux de développement et de séjour devaient précisément être les excréments des herbivores. Toutefois, Brefeld n'a pas fait d'investigations proprement dites à ce sujet, et ce qu'il en dit n'était qu'une hypothèse. Dans ces derniers temps, les insectes ne sont pas seulement considérés comme des auxiliaires pour le transport des levures dans la nature. mais encore comme le facteur le plus important pour l'hivernage (Berlese). Les promoteurs de cette manière de voir prétendent que l'hivernage a lieu le plus souvent dans le tube digestif de certaines bestioles, principalement des mouches. Au sujet de toutes ces conjectures, je ferai seulement remarquer que leur inexactitude a été démontrée par les expériences préliminaires que je fis peu de temps après la publication de mon mémoire sur la circulation. En ce qui concerne les insectes, Klöcker a effectué plus tard au Laboratoire de Carlsberg des expériences sur une assez grande échelle, et il est arrivé au même résultat que moi.

Comme les assertions ainsi mentionnées s'étaient trouvées être insoutenables, je basai mes recherches sur la supposition que les Saccharomycètes proprement dits passaient par la même circulation que le Sacch. apiculatus. Depuis qu'on avait commencé à examiner au microscope les phénomènes relatifs à la fermentation du vin, on avait su que ces champignons apparaissaient sur les fruits doux et juteux C'est pourquoi rien ne me fut plus facile que de démontrer qu'ils peuvent passer l'hiver dans le sol. Par des expériences directes, je pus constater que les Saccharomycètes proprement dits non seulement se maintiennent vivants dans la terre d'une saison fruitière à l'autre, mais qu'ils peuvent même s'y maintenir pendant trois années, donc, beaucoup plus longtemps qu'il n'en faut à la circulation pour s'accomplir. Cette question n'était toutefois pas encore résolue.

Il fallait savoir si les fruits mentionnés étaient le plus important, le véritable lieu de développement, et si le sol était le principal, le vrai séjour d'hiver de ces champignons. Si donc il en était ainsi, il fallait s'attendre, soit à les rencontrer en abondance sous ces arbres et arbustes à toutes les époques de l'année, soit à ce que, à une certaine distance, il ne s'en trouve que peu ou même pas du tout, bref, le même état de choses que celui que j'avais constaté pour le Sacch. apiculatus.

Toutefois, les analyses que j'effectuai dans ce sens, ne donnèrent pas tout de suite un résultat décisif. En effet, je trouvai en abondance dans le sol des Saccharomycètes proprement dits, et même à des endroits situés à une grande distance des jardins et où il n'y avait pas de Sacch. apiculatus; ainsi donc, je constatais un état de choses qui ne répondait aucunement à la théorie que j'avais conçue: la régularité que j'avais observée chez le Sacch. apiculatus faisait défaut.

Comme je l'ai dit plus haut, dans le Sacch. apiculatus j'avais trouvé pour mes recherches le meilleur objet que l'on eût pu imaginer. La méthode s'indiquait d'elle-même, et un heureux résultat m'était assuré d'avance. En effet, grâce à la forme en citron qui le caractérise, il suffit d'un simple examen au microscope pour en reconnaître l'existence. De plus, ses cellules se trouvent en grande quantité dans les jardins, et il se multiplie très fortement dans les liqueurs nutritives servant aux expériences en question. En concurrence avec les autres espèces de levures, il est sûr de prendre le dessus dans ces conditions. Somme toute, on est à même d'en déceler facilement la plus petite trace.

Cela n'est pas aussi facile pour les autres espèces de levure. Pour celles-là, le seul examen au microscope ne suffit point: non seulement une de ces espèces ressemble à l'autre par sa forme et ses apparences, mais elle peut même être confondue avec des cellules de levure appartenant à d'autres genres[1]). Pour pouvoir déterminer si l'espèce à examiner est un Saccharomyces ou si elle appartient à un autre genre, nous sommes obligés d'entreprendre une culture en vue de lui faire produire des spores, et cette culture demande plusieurs jours. En outre, les diverses espèces de Saccharomyces ne peuvent être distinguées les unes des autres qu'au moyen de caractères distinctifs d'ordre physio-

[1]) Tels que: Torula, Dematium, Fumago, Exoascus, *etc.*

logique, et la détermination de chacun de ces caractères ne peut se faire que par une expérience particulière. Bref, cette analyse est longue et minutieuse.

De ce que nous venons de dire, il résulte donc que, dans ce cas, nous ne pouvons pas poser la question au point de vue d'une espèce particulière, mais que nous devons nous borner, d'une façon générale, à celle de savoir si, dans les échantillons soumis à l'analyse, il existe de véritables Saccharomycètes ou non. Une autre difficulté nous est encore ménagée par la concurrence existant avec les autres micro-organismes qui se rencontrent également et dans le sol et dans les poussières de l'air. Pour amener au jour les véritables Saccharomycètes, il est nécessaire d'employer des méthodes de culture particulières; les cultures sur plaques dont on se sert ordinairement en bactériologie, ne suffisent point pour cela. Les détails que comportent ces méthodes seront donnés dans un mémoire qui paraîtra ultérieurement dans les »Comptes-rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg».

Pendant plusieurs années, je fis des petits essais qui, pas plus d'ailleurs que ceux faits plus tard par Müller-Thurgau, Wortmann et d'autres encore, ne donnèrent aucun résultat concluant: soit que les méthodes employées n'aient pas été assez précises, soit que les analyses effectuées n'aient pas été assez nombreuses. Il en faut un très grand nombre pour pouvoir se rendre compte de ce qui est la règle et de ce qui fait l'exception. Des centaines d'analyses, autant de terre que d'air, les premières surtout, sont nécessaires. Pour ces travaux, mes aides, M. M. Klöcker et Schiönning, attachés tous deux au Laboratoire de Carlsberg, m'ont prêté un concours précieux.

Si je ne termine ces recherches que maintenant, c'est que j'avais espéré que l'on parviendrait à découvrir quelque espèce pouvant être analysée par le même procédé si simple que celui employé pour la levure en forme de citron; mais cet espoir ne s'est pas réalisé.

Je passe maintenant à l'exposé de mes nouvelles recherches.

Celles effectuées aux environs de Copenhague avaient montré que les Saccharomycètes proprement dits apparaissent à toutes les époques de l'année et partout dans le sol. Le terrain en question est fortement bâti et riche en vergers. Les endroits où se développent les Saccharomycètes sont si rapprochés les uns des autres

qu'il est difficile de trouver un coin où il n'y ait pas de cellules de Saccharomyces. Ce ne fut qu'après un très grand nombre d'analyses que je parvins à me rendre compte des lignes essentielles de l'état de choses que j'avais pris à tâche d'approfondir: il était évident que c'était le sol même des vergers examinés qui était le plus riche en Sacharomycètes, et que le nombre de ceux-ci décroissait au fur et à mesure que l'on s'éloignait des jardins. A titre d'exemple, je citerai les chiffres obtenus par une série de 200 analyses: Dans 67 % des analyses, je trouvai de véritables Saccharomyces dans le sol sous les arbres et les arbustes fruitiers; dans 30 %, j'en découvris dans le voisinage, sous des hêtres, des chênes, des sapins, des pins, *etc.*; mais dans des champs écartés je ne pus en constater la présence que dans 19 %.

Les recherches faites dans le voisinage du Laboratoire permirent d'établir le fait que le sol est le quartier d'hiver des Saccharomycètes proprement dits. C'est ce que firent ressortir, non seulement mes expériences directes, qui montrèrent qu'ils se maintiennent en vie dans le sol des années entières, mais aussi plusieurs analyses qui eurent pour résultat que pendant toute l'année ils se trouvent répandus dans la terre sur une grande échelle, et que, pendant l'hiver, ils n'apparaissent ailleurs que par exception.

Pendant mes voyages en Allemagne, je continuai à m'occuper de cette question. Là aussi, je pus constater ce même phénomène toutes les fois que le nombre des analyses avait été suffisamment grand. Comme ou pouvait s'y attendre, les vignobles s'étaient montrés particulièrement riches en Saccharomycètes.

En admettant que la théorie qui formait le point de départ de ces recherches fût exacte, nous devions, en suivant les versants des montagnes, ce qui nous éloignait des jardins, nous attendre à trouver des zones pauvres en Saccharomycètes, et finalement atteindre une région où ils feraient totalement défaut. Les observations faites par moi dans le Harz et dans les Alpes confirment à merveille l'exactitude de ce raisonnement. Dans une forêt de hêtres de la Rosstrappe, il se trouva encore des cellules de Sacch. ellipsoïdeus, bien qu'en très petit nombre; dans une autre forêt située dans le voisinage de Drei Annen Hohne, il n'y avait ni espèces du groupe Ellipsoïdeus, ni des groupes Pastorianus ou Cerevisiæ, mais seulement, et extrême-

ment rares, des espèces se rattachant au Sacch. membranæfaciens et au Sacch. anomalus; enfin, au sommet du Brocken, je ne suis pas parvenu à découvrir une seule cellule de Saccharomycète.

Les Alpes se prêtent éminemment à éclaircir la question qui nous occupe. A leur pied, tant du côté nord que du côté sud, ainsi que sur leurs versants, il y a de vastes jardins présentant une végétation luxuriante de raisins et d'autres fruits, offrant, par conséquent, les meilleures conditions de développement aux cellules de levure. Au fur et à mesure qu'on s'élève, ces lieux de développement deviennent de moins en moins abondants, et à la fin, on arrive à un point où ils font tout à fait défaut. S'il est vrai que les fruits doux et juteux constituent les principaux lieux de développement des cellules de levure, il faut évidemment, à mesure que nous montons, nous attendre à atteindre des zones où ces cellules apparaîtront de plus en plus clair-semées.

Lors d'une excursion que je fis sur l'Arlberg, il y a quelques années, j'entrepris dans ce sens une petite recherche préliminaire, recherche qu'il ne m'a pas été possible, avant ce printemps, de poursuivre et d'achever d'après un plan bien arrêté. Le conseil d'administration du Laboratoire de Carlsberg m'accorda les fonds nécessaires à l'exécution de ces recherches. Je commençai mes analyses à Göschenen et les continuai dans la direction du col du St-Gothard pour descendre ensuite le versant méridional du côté d'Airolo. Plus tard, je les poursuivis aux alentours du Lac Majeur et à quelques endroits dans la plaine de la Lombardie, ensuite près de Gardone, sur la rive sud-ouest du lac de Garde, et, enfin, après avoir remonté et passé le Brenner, je gravis, jusqu'à une hauteur de 1800 m. env., la Postalpe, une des montagnes qui se trouvent à proximité du col. Le résultat de ces recherches fut conforme à celui établi par la théorie. Dans les vignes et dans les jardins où les fruits sucrés et juteux étaient abondants, comme aussi dans le voisinage de ces jardins, je voyais apparaître des espèces appartenant aux groupes Ellipsoïdeus et Pastorianus; à mesure que je gravissais les montagnes, le nombre de ces levures diminuait, et finissait par être réduit à rien.

Mes analyses faites dans le nord de l'Italie ont montré que le Saccharomyces apiculatus, tout aussi bien que les Saccharomycètes proprement dits, passent l'hiver dans le sol sous un climat considérablement plus chaud que celui du Danemark. J'insiste

sur ce fait, parce qu'on a avancé l'affirmation qu'il n'en est pas ainsi.

Les lignes fondamentales de la circulation sont déterminées par les lieux de développement et d'hivernage, comme aussi par les moyens de transport existant entre ces lieux. Outre les lieux normaux de développement, à savoir les fruits, il s'en trouve naturellement aussi d'autres: les secondaires, ainsi que nous pouvons les appeler. Les plus importants parmi ceux-ci sont les liquides du sol, principalement les extraits aqueux de parties de plantes et d'excréments. Au point de vue des principes nutritifs que ces liquides offrent aux microorganismes dont nous parlons, on y trouve une gradation qui va des liquides riches en sucre ou autres sucs nourriciers de fruits tombés des arbres jusqu'à l'eau pure. Mes expériences comparatives ont montré que, très forte dans les jus de fruits, la propagation des cellules de levure n'a lieu, dans les autres liquides du sol, que très faiblement ou même pas du tout.

Les jus de fruits constituent un milieu nutritif favorable pour toutes les espèces, ce qui n'est point le cas pour les autres liquides contenus dans le sol. Sous ce rapport, toutefois, les espèces sont différentes les unes des autres, il y en a qui exigent plus que d'autres pour leur nutrition, et le sol n'est pas partout en état de donner ce qu'elles en attendent. Parmi ces liquides nutritifs secondaires, l'extrait du fumier de cheval, pour certaines espèces du moins, est assez favorable; mais il l'est cependant beaucoup moins que les jus de fruits, et il en est de même pour l'eau ordinaire, et ce, à un degré encore plus marqué. Si, comme nous l'avons vu, les levures peuvent se rencontrer à une aussi grande distance de leurs lieux de développement ordinaires, c'est en partie en raison des lieux secondaires de développement que ces liquides forment dans la terre.

Les différentes recherches ainsi faites à ce sujet montrèrent toutes que la théorie établie par moi relativement à la circulation des levures dans la nature s'applique d'une façon générale, et non seulement au Saccharomyces apiculatus, mais aussi aux Saccharomycetes proprement dits. Entre la circulation de ces derniers et celle du Sacch. apiculatus, il n'y a qu'une seule différence essentielle: c'est que les véritables Saccharomycètes peu-

vent s'éloigner beaucoup plus de leurs foyers que le Sacch. apiculatus.

A quoi faut-il attribuer ce fait? C'est cette question que nous allons examiner maintenant.

Lorsque par l'effet du vent ou par l'intermédiaire des insectes, les cellules de levure sont emportées de leurs lieux de développement ou du sol voisin où elles se trouvaient déposées, elles se trouvent naturellement exposées à un dessèchement plus ou moins rapide. Dans ces circonstances, la spore résiste plus longtemps que la cellule végétative. Déjà rien que pour cette raison, les Saccharomycètes proprement dits sont capables de faire dans l'air, sans périr, un voyage plus long que le Sacch. apiculatus qui, ainsi que nous l'avons vu, ne produit pas ces corps de reproduction. Toutes les espèces de véritables Saccharomycètes que je mettais dans la terre en automne, pendant la saison des fruits, y développaient rapidement des spores. Lorsque celles-ci, desséchées dans les particules de terre qui les enveloppent, sont ainsi projetées dans l'air par le vent et emportées avec les nuages de poussière, elles peuvent être déposées encore vivantes à une très grande distance de leur point de départ.

Il est encore un fait qui mérite d'être signalé: c'est que les Saccharomycètes proprement dits se multiplient avec plus de facilité que le Sacch. apiculatus, dans les liquides dont la surface du sol est imprégnée Ils peuvent aussi, mieux que le Sacch. apiculatus, supporter un séjour prolongé dans l'eau. C'est pourquoi ils peuvent également être transportés en vie avec les liquides du sol beaucoup plus loin que leur congénère asporogène.

Tous ces faits nous montrent de la manière la plus naturelle pourquoi les Saccharomycètes proprement dits se répandent autour de leurs centres de développement principaux dans des rayons beaucoup plus étendus que ceux du Sacch. apiculatus.

Dans mon prochain mémoire détaillé, je parlerai aussi de ces dernières recherches d'une manière plus explicite.

Laboratoire de Carlsberg, Copenhague, novembre 1902.

LIGNES FONDAMENTALES DE LA CLASSIFICATION DES SACCHAROMYCÈTES.

(Centralbl. f. Bak., Par. u. Infektionsk., 2. Abt., Bd. XII, 1904).

PAR

EMIL CHR. HANSEN.

On sait que Reess fut le premier qui entreprit une classification scientifique des Saccharomycètes, à savoir dans les »Botanische Untersuchungen über die Alkoholgährungspilze«, qu'il publia en 1870. Selon lui, les marques distinctives caractérisant le genre Saccharomyces consistent en ce que les espèces appartenant à ce genre presentent une formation de cellules de levure sans avoir de mycélium et qu'elles se reproduisent par bourgeonnement et par formation d'endospores; les spores germent par bourgeonnement. Reess, considérant ces champignons comme étant des Ascomycètes inférieurs, les a classés dans le voisinage du genre Exoascus, et dans les points essentiels les savants contemporains se sont rangés à sa manière de voir. Par contre, sa façon d'établir les espèces souleva de fortes objections, et, peu à peu, les microbiologistes expérimentateurs arrivèrent à s'apercevoir clairement que sa classification péchait totalement par la base. C'est que Reess n'était pas expérimentateur, mais morphogiste; il n'essayait point de préparer des cultures pures, il se bornait à faire la description des cellules telles qu'il les rencontrait dans les échantillons impurs de levure sur lesquels portaient ses études. La forme et la dimension des cellules de levure, ainsi que la grandeur de la spore, étaient les caractères que ses descriptions faisaient ressortir. Si, à cet égard, ses points de vue étaient faux, son œuvre, cependant, n'en est pas moins très méritoire pour cette époque-là, et c'est ce que, à une autre occasion déjà, j'ai signalé et motivé. Même de nos jours encore,

il y a des botanistes qui ne sont pas plus avancés que lui; c'est ainsi que dans des traités descriptifs des végétaux on rencontre encore çà et là une description d'espèces, tant anciennes que nouvelles, qui ne dépasse pas le modèle établi par Reess.

Or, la voie suivie par Reess ne pouvant pas mener au but, la question devait naturellement se poser si on n'y arriverait pas en faisant une recherche expérimentale basée sur des cultures absolument pures. Il me fut donné d'entrer le premier dans cette nouvelle voie. Dans les mémoires publiés par moi en 1882, et surtout dans ceux publiés en 1883, je communiquai une suite d'éclaircissements concernant la physiologie de quelques-unes des espèces mentionnées ci-dessus, pouvant déjà alors les caractériser sur la base de nouveaux points de vue. Bientôt d'autres chercheurs ne tardèrent pas à me suivre dans cette nouvelle voie. Il en résulta une augmentation considérable de nos connaissances relatives à la physiologie et la morphologie des Saccharomycètes, ainsi que la révélation d'un grand nombre d'espèces nouvelles. Pourtant, depuis quelque temps, l'intérêt pour la classification des espèces allait diminuant. Le plus souvent, les chercheurs ne se donnaient même pas la peine de donner aux espèces un nom spécifique.

C'est, par ex., le cas pour les six types de Saccharomyces au sujet desquels je commençais en 1883 une série de recherches expérimentales et qui, dans mes diverses publications, comme aussi dans celles d'autres savants, portent toujours les noms provisoires dont je les désignais au début, à savoir:

Saccharomyces	cerevisiæ	I
—	Pastorianus	I
—	—	II
—	—	III
—	ellipsoïdeus	I
—	—	II

A l'époque où j'établissais ces types, je ne me rendais pas encore bien compte s'ils devaient être considérés comme des espèces ou comme des variétés. Dans les années qui suivirent, les caractères que je leur avais trouvés furent minutieusement vérifiés, et dans notre laboratoire de Carlsberg et ailleurs, et l'on en découvrit aussi de nouveaux. Ces types établis par moi, il y a plus de vingt ans, se sont trouvés être constants, et il n'a pas été possible d'en faire varier un seul. Me basant sur les

multiples recherches faites dans ce sens, je crois qu'on doit les regarder comme des espèces particulières.

Afin de ne point introduire plus de noms systématiques que ceux strictement nécessaires, je propose d'employer comme suit trois des noms spécifiques de Rees:

J'appellerai Sacch. cerevisiæ la première de mes six espèces citées ci-dessus, la deuxième Sacch. Pastorianus, et la cinquième Sacch. ellipsoideus. A l'espèce Sacch. Pastorianus II, je propose de donner le nom de Sacch. intermedius, et celui de Sacch. validus à l'espèce Sacch. Pastorianus III. Toutes les deux sont des levures à fermentation haute. La levure désignée par Reess sous le nom de Sacch. Pastorianus est une levure à fermentation basse, à laquelle, pour cette raison, on ne peut pas donner cette dénomination qui, au contraire, convient au Sacch. Pastorianus I. Quant à l'appellation Sacch. validus, je l'ai attachée à l'espèce qui produit une fermentation haute fortement prononcée, tandis que sous le nom de Sacch. intermedius, je désignerai celle qui accuse une fermentation haute distincte, il est vrai, mais faible, et qui tient ainsi le milieu entre le Sacch. Pastorianus et le Sacch. validus; c'est en considération de ce fait que la dénomination Sacch. intermedius lui a été donnée. Enfin, ma sixième espèce de levure (appelée jusqu'ici Sacch. ellipsoïdeus II) peut être convenablement désignée sous le nom de Sacch. turbidans, étant donné que c'est principalement cette levure qui, dans la bière à fermentation basse, engendre la maladie connue sous le nom de trouble de levure.

La matière à classifier s'accumulant pour ainsi dire chaque jour davantage, le moment devait nécessairement venir où la nécessité s'imposerait de mettre le tout en ordre afin d'en obtenir une vue d'ensemble systématique. C'est la tâche que je me suis proposé d'accomplir par ce qui va suivre. Toutefois, ainsi que le titre du présent mémoire l'indique, je n'ai l'intention de m'occuper ici que des grandes lignes; quant aux diverses espèces et variétés, j'en parlerai en détail dans un travail qui sera publié plus tard.

Plusieurs années s'écoulèrent avant que des espèces présentant des particularités nouvelles et nettement marquées fussent observées, et nous allons maintenant nous arrêter un peu à ces découvertes. Dans mon étude sur »l'Action des ferments alcooliques sur les diverses espèces de sucre«, publiée en 1888, je

décrivis la première de ces espèces sous le nom de Saccharomyces membranæfaciens. Sous le rapport de la formation de voile, elle se distingue à un degré éminent des Saccharomycètes connus à cette époque, car, cultivées dans un liquide contenant du sucre, les cellules de cette espèce ne tardent pas à former un voile de la même manière que le Mycoderma vini et le Mycoderma cerevisiæ. Ces voiles se reconnaissent à la quantité considérable d'air qui se trouve entre leurs cellules, phénomène par lequel ils se distinguent des voiles qu'on observe chez l'autre groupe de Saccharomycètes. Le Sacch. membranæfaciens se caractérise aussi d'une façon bien marquée par la forme de ses spores: jeunes, elles sont ordinairement hémisphériques, ou peu s'en faut; avec l'âge, elles prennent le plus souvent une forme anguleuse et irrégulière. En outre, cette espèce se distingue par ce fait que, dans le moût de bière, ainsi que dans des solutions de saccharose, de dextrose, de maltose ou de lactose, elle ne provoque pas de fermentation alcoolique, de même qu'elle n'est pas capable non plus d'intervertir la saccharose.

En 1891, je pouvais constater que chez le Saccharomyces Ludwigii, autre espèce établie par moi, la germination des spores a lieu d'une autre manière que chez les autres Saccharomycètes. Chez ces derniers, à l'instar de ce qui se passe chez la cellule végétative, il peut se développer des bourgeons à chaque point de la surface de la spore qui germe, alors que chez la levure nommée ci-dessus, la germination de la spore donne d'abord lieu à une formation de promycélium, lequel à son tour développe les cellules de levure.

Pour les spores jeunes, c'est une règle générale que, au cours de la germination, il se produit une fusion des promycéliums de deux spores; parfois même, il peut aussi arriver que plusieurs spores fusionnent complètement[1]). Chez les spores âgées, il ne se produit généralement pas de fusion.

[1]) Guilliermond, dans les études sur les cellules de levure, qu'il a publiées ces dernières années, s'est aussi occupé du Saccharomyces Ludwigii. Dans ses premières communications relatives à cette espèce, il insistait sur ce qu'il n'avait jamais pu observer la fusion décrite par moi; par conséquent, il se pouvait que mes constatations à ce sujet fussent dues à une erreur, possibilité signalée aussi dans divers comptes-rendus. Plus tard, cependant, après avoir examiné des matériaux nouveaux, Guilliermond a confirmé l'exactitude de mes observations. Mais cette rectification a été généralement passée sous silence dans les comptes-rendus, sa première

Il est vrai que, le plus souvent, le bourgeonnement des cellules végétatives a lieu a un des deux bouts de la cellule-mère, mais il peut aussi se produire à n'importe quel autre point de cette cellule et, en somme, ce bourgeonnement présente tous les caractères principaux du bourgeonnement typique du genre Saccharomyces, ainsi que ceux des cellules de levure en général. Sous un autre rapport, toutefois, le bourgeonnement du Sacch. Ludwigii diffère quelque peu de celui observé chez les autres Saccharomycètes. C'est que le rétrecissement cesse à une phase assez précoce de leur developpement, et à ce moment on peut encore observer une cloison transversale bien nette qui, en se déchirant, affranchit la nouvelle cellule; ce n'est qu'après que cet affranchissement a eu lieu qu'elle s'arrondit; c'est donc bien un bourgeonnement, mais un bourgeonnement avec une scission incomplète. Quant au bourgeonnement qui caractérise les espèces ordinaires de Saccharomyces, la différence n'est que graduelle et non essentielle.

Chez une espèce que je décrivais en 1891 sous le nom de Saccharomyces anomalus, je faisais la remarque que les spores avaient une forme très particulière. En effet, elles sont plus ou moins hémisphériques et munies en bas d'un bord saillant, qui les fait ressembler à un chapeau. Dès le commencement de la fermentation, cette levure provoque une formation très active d'éther et aussi de voile. En somme, c'est un champignon typique à formation de voile tout comme le Sacch. membranæfaciens, et tout ce que nous avons dit sur cette formation chez cette dernière espèce s'applique aussi au Sacch. anomalus.

Ces trois espèces se distinguent donc par des caractères fortement accusés non seulement les unes des autres, mais encore des autres espèces rapportées jusqu'ici au genre Saccharomyces. Ces caractères sont même plus accusés que ceux par lesquels, en mycologie, on distingue ordinairement les genres les uns des autres. Maintenant qu'il s'agit d'établir la classification de tous les Saccharomycètes connus à ce jour, il me semble juste de faire de ces trois espèces des types de trois nouveaux genres. J'ai déjà signalé antérieurement, et non seulement moi, mais encore P. Lindner et d'autres savants, que, lors d'un remanie-

---

observation étant seule mentionnée. C'est pourquoi je saisis cette occasion pour relever ce fait.

ment de la classification des Saccharomycètes, cette valeur-là devait leur être attribuée. La raison principale pour laquelle cette classification ne paraît qu'à présent, se trouve indiquée plus haut.

Pour le deuxième des trois genres en question, je propose la dénomination de Saccharomycodes pour indiquer sa proche parenté avec le Saccharomyces. Aux deux autres, je me permets d'attacher le nom de deux éminents confrères: je désignerai sous le nom générique de Willia le Sacch. anomalus et les espèces qui s'y rattachent, tandis que le nom générique Pichia s'appliquera au Sacch. membranæfaciens et aux espèces qui viennent se grouper autour de celle-ci. En effet, M. le Professeur et Dr Will a non seulement, à une époque peu avancée, observé des espèces appartenant au genre qui a reçu son nom, mais c'est dans son laboratoire que les recherches les plus détaillées sur ce sujet ont été faites; quant à M. le Professeur et Dr Pichi, on sait que nous lui devons des recherches, des descriptions et des figures remarquables d'un certain nombre d'espèces se rattachant étroitement à celle découverte par moi.

En 1893, P. Lindner établit un nouveau genre, qu'il désigna comme étant «un type tout à fait unique parmi les champignons de levure», et auquel il donna le nom de *Schizosaccharomyces*, qui devait indiquer la manière dont se fait sa multiplication végétative. Dans chaque cellule, il se forme une ou plusieurs cloisons fortement accusées, puis ces cloisons éclatent et les générations formées sont délivrées. Ce genre de propagation a une grande analogie avec celui de l'Oïdium et d'un grand nombre de bactéries. Aucune trace de bourgeonnement n'est visible. La seule ressemblance morphologique entre ce type et le Saccharomyces consiste dans le fait que tous deux sont capables de former des endospores. L'espèce décrite en premier lieu est le Schizosaccharomyces Pombe. Un nombre assez considérable d'autres espèces est venu s'y ajouter plus tard.

On n'a sans doute pas oublié que deux caractères généraux relient entre elles les nombreuses espèces de Saccharomyces, à savoir le bourgeonnement et la formation d'endospores. Ces caractères sont aussi importants l'un que l'autre; tout tombe si l'on en enlève un, car tous deux sont nécessaires à la délimitation des espèces entre elles. C'est pour ce motif que le genre Schizosaccharomyces ne doit pas faire partie de la famille des

Saccharomycetes. Pour le moment, on n'est pas encore en état d'indiquer avec certitude sa véritable place dans la classification des champignons; jusqu'à nouvel ordre, elle nous paraît devoir être dans le voisinage des Saccharomycètes. Ce genre de champignon diffère encore plus des Saccharomycètes que les Exoascées. Au point de vue morphologique, il se rapproche du groupe de bactéries formant des endospores. Si jusqu'à présent on l'a classé parmi les Saccharomycetes, la cause en est que, d'un côté, on ne s'interessait pas spécialement à la question de la classification, et que, d'un autre côté, on s'attendait probablement à découvrir tôt ou tard un bourgeonnement, si faible fût-il. Mais ce bourgeonnement ne s'est pas produit. Et même, malgré que nous connaissions plusieurs espèces de Schizosaccharomyces, et malgré que pendant plusieurs années de suite, tant au Laboratoire de Carlsberg qu'ailleurs, on se soit livré avec ardeur à des essais sur ce champignon, on n'est pas parvenu à observer la moindre marque d'une formation de cellules de levure.

En 1901, Barker annonçait qu'il avait découvert chez un Saccharomycète une étrange conjugation. Il fit de cette espèce le type d'un nouveau genre, le Zygosaccharomyces[1]). Le procès en question a lieu de la manière suivante: De chacune des deux cellules qui y participent, il sort un prolongement rostré. Ces prolongements sortis, ils fusionnent en se rejoignant, tandis que les parois se dissolvent sur le point de contact, ce qui fait que les deux cellules sont reliées ensemble comme par un pont; une fusion ultérieure des cellules n'a pas lieu. Les observations de Barker indiquent, sans toutefois le prouver d'une manière décisive, que la fusion qu'il a décrite est accompagnée d'une fusion des noyaux cellulaires des deux cellules. Après que la fusion des prolongements susdits a eu lieu, les spores se développent dans chacune des deux cellules. Cette espèce ressemble d'ailleurs en tout aux Saccharomyces ordinaires. Tout récemment encore, on a aussi cru observer chez d'autres Saccharomycètes un accouplement, dont le procès toutefois est un peu différent. C'est à Barker, ainsi qu'à Guilliermond, à Janssens, à Leblanc et a Wager que nous devons ces observations. Cependant, on n'est toujours pas encore d'accord, non seulement sur la manière d'interpréter exactement les faits, mais encore sur les faits mêmes.

[1]) Philosophical Trans. of the Roy. Soc. of London, Ser. B, **194**, 467.

La plupart des savants sont bien de l'avis que, dans quelques cas du moins, il se fait réellement un accouplement, mais toutefois, il est fort probable que ce n'est pas avant longtemps que la question sera résolue.

Longtemps avant qu' il ne fût question de faire des recherches exactes dans ce domaine, on faisait connaître dans la littérature médicale une espèce singulière, sous le nom de Saccharomyces guttulatus. Buscalioni découvrit des spores chez cette espèce en 1896, et, 2 ans plus tard, Wilhelmi observa la germination de ces spores, germination qu'il décrit comme suit: La spore a deux membranes. Au moment de la germination, la membrane extérieure se fend à un endroit quelconque, donc, d'une manière irrégulière. La croissance ultérieure se fait par bourgeonnement. Dans son mémoire publié en 1903[1]), Schiönning décrivait une nouvelle espèce dont la spore a également deux membranes; toutefois, lors de la germination, la membrane extérieure s'ouvre en deux valvules, et au moyen d'acide sulfurique ou d'autres acides minéraux, elle prend une teinte rosée. La germination a lieu de la même manière que chez l'autre espèce, et la multiplication végétative se fait également par un bourgeonnement normal. Cette espèce produit un mycélium très développé, et l'aspect extérieur de sa végétation diffère d'une manière frappante de celui des Saccharomycètes connus à ce jour. Se basant sur la structure particulière des spores, Schiönning réunit ces deux dernières espèces en un nouveau genre, auquel il a donné le nom de Saccharomycopsis, pour indiquer qu'il a quelque analogie avec le Saccharomyces. Schiönning a donné à sa nouvelle espèce le nom de Saccharomycopsis capsularis.

Pour finir, nous mentionnerons encore ici l'espèce découverte par Klöcker, le Saccharomyces Saturnus[2]), dont les spores sont en forme de citron et entourées d'un filet saillant; ce filet leur donne une certaine ressemblance avec la planète Saturne, et c'est pourquoi elle a reçu ce nom-là. A cause des filets qu'elle forme, et aussi parce qu'elle produit véritablement des voiles, cette espèce se rattacherait au genre Willia susnommé; mais, comme nous l'avons dit, elle en diffère par la forme de la spore.

[1]) Comptes-rendus des trav. du Lab. de Carlsb. **6,** 103.

[2]) Comptes-rendus des trav. du Lab. de Carlsb. **6,** 84, (1903).

Il est probable que l'espèce de Klöcker formera le type d'un nouveau genre, quand on aura découvert de nouvelles espèces pouvant s'y rattacher.

Toutes ces espèces mentionnées ci-dessus croissent abondamment dans les liquides nutritifs sucrés, et, comme nous l'avons indiqué, leur description est basée sur des essais de culture faits sur des cultures absolument pures. Ce n'en est pas le cas pour le Monospora cuspidata, un singulier champignon que Metschnikoff découvrit en 1884 dans quelques entomostracés[1]) (Daphnia) et dont il nous a donné la description en suite des observations qu' il fit pendant que ce champignon se trouvait dans les corps desdits entomostracés. Les spores de ce champignon ont la forme d'une longue aiguille mince, pointue aux deux bouts; dans chaque asque il n'y a qu'une spore, de là le nom du champignon. La germination de la spore se fait au moyen d'un tube germinatif qui sort du milieu de la spore et au bout duquel de nouvelles cellules se forment par bourgeonnement, cellules qui, à leur tour, se multiplient par bourgeonnement. Les essais de culture ne réussirent pas, et je ne crois pas que d'autres observations aient été faites sur cette espèce qui, cependant, mérite certainement d'être étudiée de plus près.

Quelque chose d'analogue peut s'appliquer au Nematospora Coryli. Peglion[2]) découvrit en 1897 cette espèce également très particulière, qui tient son nom spécifique du fait qu'elle séjourne dans les noisettes. Peglion en fit des cultures pures dans du bouillon additionné de gélatine. Ce champignon se multiplie par formation d'endospores et par bourgeonnement; toutefois, celui-ci, d'après les dessins et les descriptions de Peglion, n'a lieu qu' à une des extrémités de la cellule-mère, et c'est en quoi il ne ressemble pas tout à fait au bourgeonnement typique qui caractérise le genre Saccharomyces. La spore du Nematospora Coryli est très allongée, à forme de fuseau, voire même d'un fil, laissant voir à une de ses extrémités un long cil vibratile. Quand la spore germe, une ou deux cellules de levure se détachent d'une des extrémités de la spore ou

[1]) Virchows Archiv f. pathol. Anat. u. Physiol. u. f. klin. Medizin **96**, 177, (1884).

[2]) Une description détaillée de ses recherches a paru dans le »Centralbl. f. Bakt., Par. etc.« 2. Abt. **7**, 754.

même aussi des deux extrémités. Pour ce qui regarde les cellules végétatives, Peglion les décrit comme ayant une paroi double, une membrane intérieure et une extérieure, ce qui de nouveau est un caractère étranger aux Saccharomycètes, parmi lesquels néanmoins Peglion range cette espèce. Si l'on tient compte de ce qui précède, on trouve aussi dans ses autres caractères distinctifs des différences spécifiques non pas sans importance. Les comparaisons que Peglion fait entre le Nematospora Coryli et les Saccharomycètes sont basées dans certains points essentiels sur des erreurs. Le Nematospora Coryli ne croît en somme que dans des milieux nutritifs solides; le bourgeonnement n'a pas lieu dans les liquides, ce champignon n'y formant qu'un mycélium stérile. Jusqu'ici aucun autre savant que Peglion, celui qui l'a découvert, n'a fait de recherches sur ce champignon.

Dans quelques points, il y a conformité entre le Monospora, le Nematospora et une troisième espèce que, suivant ce que Metschnikoff en dit dans son mémoire précité, Bütschli doit avoir trouvée dans un Nématode libre, le Tylenchus pellucidus. Pourtant, si l'on s'en tient aux descriptions qui en ont été faites, aucun de ces trois champignons n'appartiendrait à la famille des Saccharomycètes: non seulement leur aspect extérieur, mais aussi l'ensemble de leurs caractères spécifiques indique qu'ils doivent occuper une place à part dans le système. Si nous voulons les ranger parmi les Saccharomycètes, nous devons en tout cas en faire un groupe spécial. Mes aides et moi ayant vainement cherché ces espèces, nous serions reconnaissants à qui pourrait nous envoyer des matériaux nous permettant de faire des observations.

Dans la classification des Saccharomycètes que Reess a établie, il n'y mentionne qu'un genre et décrit 7 espèces appartenant à ce genre. Actuellement, si nous comptons le Monospora et le Nematospora, nous connaissons 8 genres comprenant près de 100 espèces. Cette famille s'est donc considérablement accrue, et c'est pourquoi nous en donnons ci-après un aperçu systématique.

Famille des Saccharomycètes.

Cette famille comprend des champignons bourgeonnants, formant des endospores et des cellules de levure en abondance. Un petit nombre d'espèces seulement ont un mycélium typique.

Chacune des cellules peut devenir une cellule-mère. La spore est unicellulaire; le nombre des spores dans chaque cellule-mère est ordinairement de 1 à 4; il va rarement jusqu'à 12.

A. Véritables Saccharomycètes.

1er Groupe.

Dans des milieux liquides sucrés les cellules forment immédiatement un dépôt de levure, et beaucoup plus tard seulement, un voile dont la végétation est glaireuse sans mélange d'air. La spore est lisse, ronde ou ovale, avec 1 ou 2 membranes. La germination se fait par bourgeonnement ou par la formation de tubes germinatifs (Promycelium). Toutes les espèces appartenant à ce groupe ou, en tout cas, le plus grand nombre d'entre elles, provoquent une fermentation alcoolique.

Genre I. Saccharomyces Meyen.

Les spores sont pourvues d'une membrane et germent par bourgeonnement. Outre des cellules de levure, quelques-unes des espèces de ce genre forment aussi un mycélium avec des cloisons transversales très accusées.

A ce genre appartiennent les 6 espèces dont j'ai parlé précédemment et que j'ai décrites en 1883, ainsi que celles décrites les années suivantes par moi, par Aderhold, Artari, Beijerinck, Forti, Grønlund, Holm, Jørgensen, Kayser, Klöcker, Van Laer, Lendner, Lindner, Marshall-Ward, Marx, Osterwalder, Prinsen Geerligs, Seifert, Wehmer, Went, Will, Wortmann, Yabe, Zopf, et d'autres encore. De même, les espèces de levures dont il a été parlé dans les rapports des laboratoires zymotechniques et qui ordinairement sont décrites d'une manière imparfaite, espèces employées dans la fabrication de la bière, de la levure pressée et des alcools, comme aussi dans la fermentation du vin de raisins et du vin de fruits, appartiennent aussi à ce genre.

Genre II. Zygosaccharomyces Barker.

Se distingue par la copulation de ses cellules; mais cette distinction à part, il se rapporte au genre précédent.

A ce genre appartient l'espèce susmentionnée, décrite par Barker.

Genre III. Saccharomycodes E. Chr. Hansen.

Lors de la germination des spores, qui sont pourvues d'une membrane, il se forme un promycélium. Un bourgeonnement avec un détachement incomplet a lieu tant du promycélium que des cellules végétatives. Formation de mycélium avec cloisons transversales distinctes.

Deux espèces appartenant à ce genre sont connues, à savoir: le Saccharomycodes Ludwigii (Syn. Saccharomyces Ludwigii E. Chr. Hansen) dont nous avons parlé dans ce qui précède, et une autre espèce dont Behrens a donné une description détaillée et approfondie dans Wochenschr. f. Brauerei, 1896, p. 850, sans toutefois lui attacher de nom distinctif.

Genre IV. Saccharomycopsis Schiönning.

La spore a 2 membranes; autrement, les caractères distinctifs de ce genre se rapportent, pour autant qu'ils sont connus, à peu près à ceux du genre Saccharomyces[1]).

Saccharomycopsis guttulatus (Syn. Saccharomyces guttulatus Aut.).
Saccharomycopsis capsularis Schiönning.

2ème Groupe.

Dans les milieux nutritifs sucrés, les cellules forment immédiatement un voile, qui, par suite de l'air qui vient s'y mélanger, est sec et opaque; ce voile se distingue nettement de celui formé par les cellules du 1er groupe. Les spores sont hémisphériques, anguleuses, en forme de chapeau ou de citron; dans ces deux derniers cas, elles sont garnies d'un filet saillant, lisses d'ailleurs et pourvues d'une seule membrane. La germination a lieu par bourgeonnement. La plupart des espèces se distinguent par une formation d'éther; quelques-unes ne provoquent aucune fermentation.

Genre V. Pichia E. Chr. Hansen.

La spore est hémisphérique, ou irrégulière et anguleuse. Aucune fermentation; forte formation de mycélium.

Pichia membranæfaciens (Syn. Sacch. membranæfaciens E. Chr. Hansen). De même aussi, quelques espèces décrites par Pichi. A ce genre appartiennent probablement aussi les deux espèces de Lindner: Saccharomyces hyalosporus et Sacch. farinosus.

Genre VI. Willia E. Chr. Hansen.

La spore est en forme de chapeau ou de citron, avec un filet très marqué. La plupart des espèces forment de l'éther en abondance; peu d'entre elles ne provoquent pas de fermentation.

---

[1]) Chez le Saccharomycopsis guttulatus, la formation de voile n'a pas encore été examinée; chez le S. capsularis, elle montre plus tard une grande ressemblance extérieure avec celle produite chez l'Oïdium lactis. Selon toutes probabilités, on arrivera à sentir la nécessité de former un groupe spécial de ce genre.

Willia anomala Syn. Sacch. anomalus E. Chr. Hansen).

Willia Saturnus (Syn. Sacch. Saturnus Klöcker). De même aussi les espèces et variétés décrites par Steuber dans la Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen, 1900.

B. Saccharomycètes douteux.

Le Monospora Metschnikoff et le Nematospora Peglion. Pour ce qui concerne les caractères génériques et spécifiques, voir ce qui en est dit précédemment.

Laboratoire de Carlsberg, mai 1904.

SUR LES FOYERS DES LEVURES ALCOOLIQUES SITUÉS AU-DESSUS DE LA SURFACE DU SOL.

(Centralbl. f. Bakt., Par. u. Infektionsk., 2. Abt., Bd. XIV, 1905).

PAR

EMIL CHR. HANSEN.

Lorsque, il y a deux ans, je publiai dans le «Centralbl. f. Bakt., etc.», 2. Abt. **10**, 1 [1]), quelques nouvelles recherches sur la circulation des levures dans la nature, j'avais l'intention de les faire suivre à bref délai du mémoire plus détaillé auquel je faisais allusion. Ayant toutefois dû constater que de nouvelles analyses étaient nécessaires, et comme il s'écoulera encore un certain temps avant qu'elles ne soient entièrement terminées, je me bornerai, cette fois encore, à communiquer les nouveaux résultats principaux qui se sont produits depuis. En écrivant cet exposé, je suppose que le lecteur a déjà pris connaissance de mon mémoire précité.

On se souvient sans doute que quelques savants soulevèrent la question de savoir si les espèces appartenant au genre Saccharomyces hivernent aussi normalement dans le sol des pays dont le climat est considérablement plus chaud que celui du Danemark et de l'Europe centrale, comme, par exemple, en Italie. Dans le mémoire en question, j'ai donné un exposé sommaire de mes recherches à ce sujet dans le nord de l'Italie. La Donation Carlsberg m'ayant alloué une bourse, j'eus ainsi la possibilité d'entreprendre des recherches passablement étendues tant dans les environs de Florence que dans la région située entre Rome et Velletri.

Ces nouvelles recherches confirmèrent, elles aussi, dans ses

[1]) Comptes-rendus des trav. du Laboratoire de Carlsberg, **9**, 39.

points essentiels, ma théorie sur la circulation des cellules de levures dans la nature, et j'eus encore ce même résultat lorsque je renouvelai dans le Harz et dans les Alpes (Bozen, Gossensatz, Brenner quelques-unes des analyses que j'y avais faites autrefois à ce sujet.

Dans mes premieres communications sur la circulation des levures, je ne m'étais pas arrêté à la question de savoir si ces champignons se formaient ailleurs que dans les fruits doux et juteux. Je fis plus tard dans ce sens une recherche beaucoup plus etendue et plus suivie, et j'en communiquai le résultat dans le memoire cité plus haut. Dans ce mémoire, j'établissais deux categories de sources d'alimentation différentes l'une de l'autre: les primaires et les secondaires. Les sources primaires sont formées par les fruits mûrs, doux et juteux; les sources secondaires, par les extraits aqueux des restes décomposés de végétaux et d'animaux, parmi lesquels le fumier est aussi compris, tandis que le jus des fruits doux ne l'est pas. Ces recherches montrèrent clairement que le sol non seulement sert de lieu de séjour, mais que le plus souvent il est aussi le lieu où s'opère une multiplication plus ou moins nette.

Ces résultats obtenus, je fus tout naturellement amené à faire une serie de nouvelles recherches. On savait bien que des particules de terre peuvent aussi être portées sur des objets se trouvant au-dessus de la surface de la terre, souvent même à des hauteurs considérables; mais il s'agissait de savoir si, dans ces particules, on peut aussi trouver des cellules de levure. Des recherches antérieures avaient établi que ce n'est qu'exceptionnellement que la poussière et les minces couches de terre qui sont restées un certain temps dans de tels endroits, peuvent renfermer des cellules vivantes; le plus souvent, celles-ci ne tardent pas à périr, étant dans ces conditions-là exposées à être bien vite desséchées. Quelque chose d'analogue se produit dans les couches supérieures du sol, lorsqu'elles ne sont pas couvertes de végétation mais qu'elles restent exposées directement à l'action des rayons du soleil et à l'influence du climat. Mais un examen plus approfondi nous montre que des parties de terre plus ou moins grandes non seulement sont projetées en l'air et déposées sur divers objets se trouvant au-dessus de la surface du sol, mais aussi que ces parties ne tardent pas à être envahies par des organismes végétaux, de sorte que la végétation qui

normalement se fait dans la terre, se continue dans l'air. Dans les arbres creux, sur les murs, les rochers, les pierres, les pieux et les palissades, *etc.*, nous trouvons souvent des couches de terre couvertes de petites touffes d'herbe comme aussi d'autres plantes; mais ce sont surtout les mousses et les lichens ainsi que d'épaisses couches d'algues vertes qui les recouvrent, de même que la plupart des troncs d'arbre et souvent aussi des couches de terre passablement épaisses; nous nous trouvons donc en présence de phénomènes analogues à ceux qui prédominent dans les couches supérieures du sol. Ces végétations ont un fond composé non seulement de couches de terre, mais aussi de plantes décomposées. Chacun sait que les mousses, notamment, commencent à mourir par le bas et augmentent ainsi par leur croissance la couche des plantes décomposées. Justement, les mousses sont connues pour la facilité avec laquelle elles interceptent et retiennent la poussière et pour l'avidité avec laquelle elles absorbent l'humidité de l'air. Ce que nous avons dit des végétations de mousses se rapporte aussi, en partie du moins, aux végétations de lichens et d'algues vertes. Lorsque ces végétations croissent non seulement sur le sol mais aussi au-dessus de sa surface, elles offrent donc, à plusieurs points de vue, des conditions favorables au développement des cellules de levure.

Un grand nombre d'espèces de levure ayant été cultivées dans des extraits aqueux de ces végétations avec les parties décomposées conjointement avec la terre y adhérente, montrèrent toutes une multiplication distincte, qui répondait sensiblement à celle qui s'était produite dans des extraits aqueux de végétations analogues provenant de la terre située au-dessous des autres végétations. De même aussi, on peut dans la nature voir une conformité manifeste entre les végétations de levures que nous trouvons, par ex., sous la mousse qui couvre un tronc d'arbre, et celles qui se sont fixées au sol sous cet arbre; de même, dans lesdits foyers situés au-dessus du sol, elles se rencontrent aussi bien à toutes les époques de l'année que dans les foyers analogues se trouvant dans le sol même. Comme nous l'avons fait remarquer plus haut, dans les légères couches de terre qu'on peut trouver, par ci, par là, dans des fentes de l'écorce des arbres, sur les pierres et sur d'autres objets, et qui ne sont couvertes d'aucune végétation, les cellules de levure qui pourraient y être, se dessèchent et meurent en peu de temps. Sous ce

rapport, les cellules de levure sont, en général, très sensibles. J'ai donné sur cette question une série de renseignements qui ont été publiés dans les Comptes-rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg. Plus tard, j'ai procédé à d'autres analyses, en ayant spécialement en vue les questions particulières qui nous occupent ici. J'ai pu constater que Willia anomala et Pichia membranæfaciens[1]) peuvent supporter un dessèchement plus prolongé que les autres Saccharomycètes examinés. Ces deux espèces possèdent également, dans les liquides nutritifs secondaires dont nous avons parlé, un pouvoir de multiplication plus grand que celui de la grande majorité des Saccharomycètes. Ces circonstances nous expliquent le fait que justement ces champignons se trouvent appartenir aux espèces qui se montrent à une grande distance des lieux primaires de développement, espèces qui peuvent supporter des périodes de sécheresse persistante, alors que la plupart des autres espèces en meurent.

Par contre, le Saccharomyces apiculatus est sous ces rapports une espèce particulièrement sensible. Si nous considérons le peu de résistance que la plupart des espèces de levure peuvent faire au dessèchement, nous comprenons alors pourquoi nous trouvons dans les épaisses forêts au feuillage touffu et au sol humide, des végétations de levures beaucoup plus abondantes que celles que nous trouvons en pleins champs, et pourquoi c'est surtout dans ces derniers que se montrent les grandes variations. Le même petit coin de terre, la même touffe de mousse, qu'ils soient sur une pierre ou sur un arbre, peuvent dans le courant d'un seul et même mois donner des résultats tout différents; la première fois, les cellules de levure y sont très nombreuses, la seconde fois, on n'en voit plus que très peu.

Au cours des années, j'ai eu à plusieurs reprises, et principalement pendant mes voyages en Allemagne, l'occasion de faire des recherches relatives aux conditions d'existence des levures dans les vignobles. Pendant un certain temps, le fait que plusieurs échantillons de terre provenant de vignobles contenaient parfois moins de cellules de levures — celles de vin y comprises — que n'en contenaient des échantillons analogues pris dans

[1]) Le type de ces deux genres sont les deux espèces que j'ai précédemment décrites sous les noms de Saccharomyces anomalus et Sacch. membranæfaciens. V. mon mémoire: »Lignes fondamentales de la Classification des Saccharomycètes».

les prés avoisinants, me paraissait inexplicable. Il arriva même, dans quelques cas, qu'un assez grand nombre d'échantillons de terre provenant de vignobles (de 50 cc. chacun) ne renfermaient pas une seule cellule vivante pouvant être rapportée à l'espèce de Saccharomyces ellipsoïdeus. Et pourtant, dans tous les endroits examinés, les ceps avaient donné à la dernière vendange un rendement abondant de raisins mûrs. Des irrégularités analogues, quoique pas tout à fait aussi grandes, s'étaient fait remarquer dans quelques analyses de terre provenant de divers champs et vergers situés dans les environs de Copenhague. Le fait que nous ne trouvâmes pas une seule cellule de levure là où antérieurement il y en avait eu en abondance peut, dans la plupart des cas, être dû à ce que les cellules qui s'y trouvaient, étaient mortes par suite de resserrement. Si, de temps à autre, nous trouvons de ces cellules en assez grande quantité en dehors des foyers primaires, il faut en chercher la cause, premièrement, dans l'existence de lieux secondaires de développement particulièrement favorables et, secondement, dans le fait qu'elles avaient été protégées contre le dessèchement. Il est très important, pour ces recherches, d'étudier l'influence du resserrement ainsi que la nature des foyers secondaires.

Une recherche faite sur la manière d'être des espèces vis-à-vis de la température, donne aussi, à plus d'un point de vue, des éclaircissements sur ce qui se passe dans la nature. Plusieurs espèces conservent encore à une température de 0^0 leur pouvoir de se multiplier, mais, dans ces conditions-là, la seule formation d'un bourgeon exige plusieurs mois, même si les cellules se trouvent dans un liquide nutritif favorable à la formation. On peut dire que, en général, la multiplication s'arrête à une température d'environ $1—2^0$ C., et que ce n'est qu'à des températures beaucoup plus élevées qu'elle est active.

Ces mêmes phénomènes se retrouvent dans le fait que, dans un seul et même endroit, nous voyons la quantité des cellules de levure varier très fortement suivant les diverses époques de l'année. C'est à l'époque de la maturité des fruits qu'elles sont le plus nombreuses. A cette saison-là, ce ne sont pas seulement les conditions de température et les sources d'alimentation qui, la plupart du temps, sont favorables, mais aussi, et à un degré suffisant, les conditions d'humidité, la terre donnant à cette époque son maximum de foyers primaires. De cela, il s'ensuit que les

foyers secondaires sont aussi et en même temps particulièrement favorables. Cette période passée, il se fait dans le courant de l'année, de grandes variations qui, ainsi que nous l'avons dit plus haut, se font surtout remarquer dans les endroits où un fort dessèchement peut avoir lieu.

Dans quelques-uns des extraits aqueux que nous avons mentionnés, le bourgeonnement s'était fait si lentement que même à la température optima, il s'était passé plusieurs mois avant que la végétation formée fût visible à l'œil nu. C'est donc ce qui répond à ce que nous pouvons constater lorsque la multiplication a lieu dans des liquides nutritifs appropriés et à une température de 0° ou à peu près.

Quoique tous les lieux secondaires de développement examinés soient loin de produire une multiplication aussi forte que les lieux primaires, ils n'en sont cependant pas moins très importants, étant donné qu'ils sont si largement répandus dans la nature. Ces faits nous donnent également l'explication de phénomènes qui jusqu'ici étaient restés incompréhensibles.

Les résultats de mes recherches sur la circulation des cellules de levure s'appliquent également, dans leurs points essentiels, aux espèces des genres Torula et Mucor ainsi qu'à plusieurs espèces de bactéries. Nous savons que les Torula forment des cellules de levure qui se rapprochent de celles des Saccharomycetes; nous savons aussi que plusieurs espèces de ce soi-disant genre de Torula proviennent de types primitifs supérieurs; il en résulte donc une interruption dans la circulation, ce qui n'est pas le cas pour les Saccharomycètes. En ce qui concerne les espèces du genre Mucor, elles montrent certaines différences dues à ce fait que le fumier et les autres matières nourricières ont pour elles une importance autre que pour les Saccharomycètes. Quant à la force extraordinaire de résistance que ces champignons opposent au dessèchement, je me bornerai aussi à la mentionner ici, me réservant de m'étendre plus longuement sur ces phénomènes dans un mémoire à part.

Mes nouvelles recherches ont pleinement confirmé la thèse que j'avais établie précédemment, à savoir que le sol est le lieu d'hivernage principal et, somme toute, le principal lieu de séjour des microorganismes à toutes les époques de l'année.

Dans le volume XIV du «Centralbl. f. Bakt., etc.», 2. Abt., deux travaux ont été publiés dernièrement dans lesquels les

auteurs: M. M. Heinze (v. p. 9) et Müller-Thurgau (v. p. 226), parlent de mes recherches, ce qui me fournit l'occasion de faire les remarques suivantes.

Lorsque certains passages sont détachés de l'ensemble et résumés sommairement, il peut en résulter des erreurs et en sortir tout autre chose que ce que l'auteur cité a voulu dire. C'est le cas de l'article de M. Müller-Thurgau. En le lisant, on a l'impression que les recherches que j'avais faites jusqu'en 1882 sur la circulation des levures dans la nature ne sont basées que sur quelques essais faits avec de la terre en pots; mais mes mémoires ont prouvé qu'il n'en est point ainsi. Mes recherches sur le Saccharomyces apiculatus furent justement et tout particulièrement basées en même temps sur d'innombrables analyses d'échantillons de pleine terre. C'est pourquoi, quand je fus à même d'établir comme un des résultats obtenus par mes recherches, que cette espèce de levure se trouve en vie dans la terre à toutes les époques de l'année, ce n'est pas uniquement aux essais en pots que je le dois. Dans les nombreuses analyses d'échantillons de terre provenant des environs de Copenhague, analyses qui ont été décrites dans mon mémoire sur la circulation dans la nature du Saccharomyces apiculatus, je n'ai évidemment pas pu éviter d'y trouver en même temps d'autres espèces de levures (comme par ex. Sacch. cerevisiæ, Sacch. ellipsoïdeus et Sacch Pastorianus); elles étaient là, pour ainsi dire, sous mes yeux et, comme j'avais découvert la circulation du Saccharomyces apiculatus, la pensée me vint tout naturellement que d'autres espèces de levure pouvaient bien, elles aussi, avoir une circulation analogue à celle du Saccharomyces apiculatus. Cette fois-là déjà, j'avais pu démontrer avec certitude que la terre est aussi un lieu d'hivernage pour ces autres espèces; seulement, je n'avais pas encore été à même de dire si elle en était le seul, ou, aussi, si elle en était le lieu normal.

Dans les analyses d'échantillons de terre, il est facile d'observer aussi ces cellules de levure; mais, pour le moment, nous ne sommes pas encore en état de suivre une espèce déterminée des groupes susnommés qui en sont si extraordinairement riches, dans sa route à travers la nature, ainsi qu'il en a été le cas pour le Saccharomyces apiculatus. Les cellules que dans ces analyses nous désignons comme étant par ex. des Sacch. ellipsoïdeus, peuvent parfaitement appartenir à diverses espèces; dans ce dernier

cas, la nature des choses est donc tout autre que pour le Sacch. apiculatus. C'est pourquoi les essais d'ensemencement sont d'une grande importance pour ces expériences-là. Ce n'est que par ce moyen que nous pouvons déterminer si une certaine espèce à un endroit donné en pleine terre peut y vivre pendant un certain espace de temps, ou non. Aussi, c'est ce qui me décida à me servir tout particulièrement d'essais en pots pour mes expériences avec les Sacch. cerevisiæ, Sacch. ellipsoïdeus et Sacch. Pastorianus. On peut ainsi travailler dans les mêmes conditions que celles trouvées dans la nature. Les essais décrits dans mes mémoires publiés en 1881 et 1882, montrent aussi que cette manière de procéder est bonne, lorsque l'essai ne doit pas se prolonger au delà d'une année, mais si, par contre, cet essai devait durer plusieurs années, on devrait alors se servir de tubes en terre, par ex., de tubes Chamberland. Bien que, par ces essais en pots, j'eusse été mis à même de pouvoir constater que les cellules ensemencées du Sacch. cerevisiæ, du Sacch. ellipsoïdeus et du Sacch. Pastorianus s'étaient maintenues en vie d'un automne à l'autre, je ne pus néanmoins pas en conclure que ces cellules eussent la même circulation que le Sacch. apiculatus. En commençant mes recherches, j'eus l'occasion de faire encore d'autres observations qui peuvent s'ajouter à celles mentionnées ci-dessus, à savoir que, par moments, nous pouvions trouver sous les ceps de vigne, les arbustes et les arbres fruitiers moins de cellules de levure que dans les champs, et, en outre, d'autres phénomenes qui ne répondaient pas précisément à ma théorie. C'est a ces difficultés que plus d'une fois j'ai fait allusion dans mes mémoires, alors que j'appuyais sur la nécessité de faire ultérieurement de nouvelles recherches. Mes remarques n'ont pas toujours été comprises, et c'est pourquoi je suis revenu sur ce sujet. En effet, des études compliquées basées sur de nouveaux points de vue et des centaines d'analyses ont été nécessaires pour éclaircir cette question.

En 1889, Müller-Thurgau a publié une recherche qu'il avait faite sur la présence du champignon de levure de vin dans la terre. Si, personnellement, il n'a pas fait d'essais d'ensemencement, c'est qu'il n'avait pas voulu poser de question relativement à la circulation: il n'avait pas eu d'autre but que celui de rechercher si, dans la terre d'un vignoble situé près de Geisenheim, il se trouvait, à toutes les époques de l'année, des

cellules de levure pouvant être considérées comme appartenant au champignon de levure de vin. Il reconnut qu'il en était ainsi, d'accord en cela avec mes recherches dans les environs de Copenhague. Müller-Thurgau a fait aussi des recherches pour savoir jusqu'à quelle profondeur les cellules de levure peuvent être trouvées en vie dans la terre, et c'est lui qui, le premier, a apporté des renseignements sur cette question.

Heinze a oublié de mentionner ce dernier fait dans son aperçu historique du problème de la circulation. Mais comme, par ailleurs, il a indiqué les principales publications relatives à ce sujet, je me bornerai donc à y renvoyer mon lecteur. Dans un prochain mémoire, je rendrai compte en détails du fait en question, comme aussi des autres phénomènes se rapportant à la question mentionnée dans ce qui précède.

Laboratoire de Carlsberg, à Copenhague, avril 1905.

LEVURE HAUTE ET LEVURE BASSE.

ETUDES SUR LA VARIATION ET L'HÉRÉDITÉ.

(Centralbl. f. Bakt., Par. u. Infektionsk. 2. Abt., Bd. XV, 1905).

PAR

EMIL CHR. HANSEN.

Il y a certaines questions auxquelles, au cours du temps, les physiologistes et les chimistes qui s'occupent de la fermentation sont toujours revenus. Parmi ces questions se trouve aussi celle de savoir si une seule et même espèce de levure peut être tout a la fois et une levure haute et une levure basse, ou bien, si chacun de ces deux types se rattache à son espèce déterminée. Les anciens auteurs présentaient la transformation de la levure haute en levure basse, et celle de la levure basse en levure haute, comme une chose très facile. Mais les recherches exactes, basées sur la culture absolument pure, firent voir que leurs méthodes suivant lesquelles la transformation d'un type de levure en un autre pouvait se faire, étaient absolument fausses. Toutefois, des avis contradictoires n'ont pas encore cessé de ce faire jour et de se faire valoir dans la littérature zymotechnique.

Dans mes publications parues entre 1880 et 1885, on trouve la description de mes recherches sur les phénomènes de fermentation mentionnés ci-dessus, et, dans un de mes mémoires publiés en 1886 (voir les Comptes-rendus des trav. du Laboratoire de Carlsberg, **2**), je rendais compte de la manière dont des phénomènes de fermentation haute pouvaient se produire dans des experiences faites sur de la levure basse pure; mais j'ajoutais que ces phénomenes disparaissaient après quelques cultures. Je signalais aussi que de la levure haute typique pouvait se montrer a travers plusieurs générations comme levure basse; toutefois, ces changements n'étaient également que de nature passagère.

Au courant de l'été de 1884 déjà, environ un an après que

j'avais réussi à faire adopter et à mener à bonne fin la culture pure à la brasserie Vieux-Carlsberg, j'avais observé en collaboration de M. A. v. d. Aa Kühle, directeur de ladite brasserie, un cas où des échantillons de la levure basse N° 2 de Carlsberg montraient immédiatement une fermentation active avec des phénomènes de fermentation haute lorsque — après un séjour de quelques semaines dans une des glacières de la brasserie, tant dans de la bière que dans du moût et aussi sous forme de levure pressée — ces échantillons furent ensemencés dans du moût qui se trouvait dans une cave à fermentation; là aussi, nous pûmes constater que la végétation était revenue rapidement à son point de départ. On peut également ranger dans cette catégorie l'essai que fit Henneberg avec une levure basse de bière de Dortmund (Wochenschr. f. Brauerei 1900, p. 633). Cette levure, dont on s'était servi depuis près d'un an dans une brasserie et qui, pendant tout ce temps, avait donné des résultats satisfaisants, se mit ensuite à montrer des phénomènes de fermentation haute. Pour ce qui concerne la formation de mousse et celle de levure de dépôt, cette levure se rapprochait sensiblement des levures hautes. Henneberg isola 15 cellules de la culture pure primitive et s'en servit pour faire des expériences. Les végétations qui en résultèrent se comportèrent toutes comme nous l'avons dit plus haut; l'auteur ne dit rien des autres cellules, ni de la cause du phénomène observé. Au sujet de cette recherche dont il a donné un résumé dans Koch's «Jahresbericht», Will trouve que, en tout cas, il n'y avait pas de phénomènes typiques de fermentation haute; il fait remarquer qu'une aération trop intensive du moût dans les appareils propagateurs de la levure pouvait aussi être la cause de ces phénomènes anormaux ressemblant à une fermentation haute. L'année suivante, dans la «Wochenschrift f. Brauerei», P. Lindner dit que, parmi les brasseries dans lesquelles la levure susnommée était employée, un certain nombre en exprimaient maintenant leur satisfaction, ladite levure étant rapidement revenue à son état normal et, pendant de nombreuses fermentations, n'ayant plus montré de variation. Dans ces brasseries, on employait des appareils propagateurs de la levure pure. Ainsi donc, cette observation répondait essentiellement à la mienne. La manière de voir que, dans ce domaine, il n'y avait pas de transformation réelle, mais tout au plus une transformation apparente purement

provisoire, était maintenant généralement admise. Les espèces de levure haute étaient considérées comme une catégorie indépendante formant l'opposé des levures basses. On était encore loin d'être au clair sur le véritable état des choses.

Les recherches que je fis en 1888 et 1889 sur la variation de la levure basse N° 1 de Carlsberg et sur celle du Saccharomycodes Ludwigii, ont apporté un peu de clarté dans ces questions. Nous vîmes comment, sous le rapport de la forme chez la première espèce citée et sous le rapport de la sporulation chez la deuxième, plusieurs catégories peuvent procéder d'une seule cellule; en outre, comment ces catégories pouvaient soit revenir à leur point de départ, soit rester constantes, pendant un certain temps du moins. Il était donc tout naturel de supposer que quelque chose d'analogue avait dû se produire, non seulement dans les cas décrits par Henneberg, mais aussi dans les observations que j'avais faites sur des levures hautes et basses et dont j'avais fait l'exposé dans mon mémoire publié en 1886. Cependant, ce n'est pas chose facile que d'interpréter exactement cette variation, même en laissant de côté pour un moment la question de savoir quels sont les facteurs qui ont provoqué lesdites variations. Pour y arriver, il faut un nombre extraordinairement grand de végétations provenant chacune d'une seule cellule et, d'autre part, une culture prolongée dans des conditions variant fortement; en faisant seulement quelques essais, on n'obtiendra aucun résultat. Nous devons avant tout être bien au clair sur ce que nous devons entendre par le phénomène de la fermentation haute et celui de la fermentation basse. Les descriptions qu'on en fait dans les manuels et les traités de chimie et de physiologie de la fermentation sont non seulement dépourvues de clarté, mais elles sont en même temps plus ou moins inexactes. La fermentation haute différerait de la fermentation basse en ce que pendant la fermentation la levure monte à la surface du liquide et s'y dépose, ce qui n'est pas le cas pour une fermentation basse, laquelle, au contraire, serait indiquée par le dépôt de levure qui se fait au fond. En réalité, les choses ne se passent pas ainsi, car il y a des espèces typiques de levure basse qui laissent monter quelques cellules — relativement peu, il est vrai, — à la surface du liquide, tandis que le contraire se produit également, à savoir que des espèces typiques de levure haute peuvent aussi former un dépôt de levure.

J'ai fait toute une série d'essais dans le but spécial de trouver une explication juste de ces deux phénomènes.

Ces phénomènes furent d'abord observés dans la pratique industrielle, et ce sont ces observations pratiques qui nous en avaient fait concevoir l'idée que nous en avons; c'était donc aussi sur ces observations que devaient se baser les dispositions à prendre pour ces essais. Il est facile, non seulement au praticien, mais même aussi à une personne peu expérimentée, de reconnaître si une fermentation dans une brasserie est une fermentation basse ou une fermentation haute; on est immédiatement à même de constater qu'on se trouve en présence de deux phénomènes de fermentation nettement distincts l'un de l'autre; mais, quand la question se pose au laboratoire où nous opérons sur de petites cultures, il se présente des difficultés dont nous devons tenir compte. Dans les flacons Freudenreich, généralement employés dans les laboratoires, le phénomène de la fermentation haute ne se produit le plus souvent pas du tout, ce qui est aussi fréquemment le cas avec les ballons Pasteur à deux cols.

Il faut aussi tenir compte du liquide qu'il s'agit de faire fermenter, ce point ayant aussi son importance. En un mot, nous devons organiser les essais à faire au laboratoire en nous réglant sur les conditions existant en brasserie. C'est pourquoi nous nous servons de moût houblonné (d'une concentration de 13 à 14 % Balling) et, en guise de «cuves à fermentation», de verres cylindriques de 25 cm. de hauteur et 5 cm. de diamètre, ou aussi d'éprouvettes de 165 mm. de hauteur et 22 mm. de diamètre. On remplit de moût aux trois quarts le verre choisi, qu'on bouche — pas trop serré — avec un tampon de coton. Afin de pouvoir travailler avec plus de sûreté, il est bon de recouvrir ce bouchon avec une capsule d'étain, ou avec du papier à filtrer ou toute autre matière appropriée. Pour les expériences que je vais décrire, j'ai employé des capsules d'étain, évitant toutefois de les faire joindre trop serré. Les éprouvettes ayant des bouchons rodés à l'émeri, pareils à ceux des flacons Freudenreich, sont excellentes, mais coûteuses, lorsqu'on doit opérer avec plusieurs milliers, ainsi qu'il en a été le cas pour les analyses suivantes. Nous appelons levures hautes les espèces de levure qui, dans ces conditions-là, produisent des phénomènes de fermentation comme ceux observés dans les brasseries à fermentation haute, et levures basses, celles qui montrent des phé-

nomènes de fermentation pareils à ceux qui se font voir dans les brasseries à fermentation basse. Pour ensemencer, nous nous sommes servi de deux espèces de levure bien connues dans la pratique des brasseries, espèces qui se trouvent d'ailleurs dans la plupart des laboratoires zymotechniques, à savoir, comme levure haute, le Saccharomyces cerevisiæ (Syn. S. cerevisiæ I), et comme levure basse, la levure basse N° 1 de Carlsberg[1]).

Le Saccharomyces cerevisiæ est une ancienne levure haute qui, vraisemblablement, a été employée depuis des siècles dans les brasseries anglaises et écossaises. Ce champignon est le véritable type de la levure haute. Nous allons maintenant examiner les phénomènes que cette levure nous montre. Les cultures peuvent se faire soit à la température ordinaire du laboratoire, soit à celle de 25° C. Dans ce dernier cas, j'ai constaté qu'il était pratique de laisser la culture à cette température élevée jusqu'à ce que la mousse de fermentation soit formée, ce qu'on obtient ordinairement dans les vingt-quatre heures après un ensemencement tant soit peu abondant d'une végétation jeune et vigoureuse. On la laisse ensuite à la température ordinaire du laboratoire, où le phénomène se produit alors d'une manière plus accusée qu'il ne se serait produit si la culture était restée tout ce temps à la température de 25° C. L'apparition du phénomène est favorisée par l'emploi d'une haute colonne de moût et l'aération de celui-ci, joints à une température pas trop basse, ainsi que par un ensemencement abondant. Les deux conditions soulignées sont les conditions les plus importantes. La mousse se compose généralement de toutes petites bulles et, à une lumière plus intense, on pourra constater dès le commencement de la fermentation déjà, que non seulement les petites bulles, mais aussi les parties vides, sont recouvertes d'une mince couche de levure. L'ensemencement a-t il été abondant, après un repos de trois jours à la température du laboratoire, toute la couche de mousse est déjà recouverte d'une couche de levure épaisse, luisante et compacte. Cette couche de levure se porte contre les parois du verre, où elle forme un anneau visqueux plus ou moins épais au-dessus de celle d'où il provient. L'ensemencement n'a-

[1]) Ces espèces, de même que les autres mentionnées dans ce mémoire, ont été décrites dans mes écrits antérieurs. Pour ce qui concerne les nouveaux noms, voir mes «Lignes fondamentales de la classification des Saccharomycètes».

t-il été que très faible, on ne trouve à cette époque qu'une couche épaisse de mousse. Dans ces cultures-là, la fermentation ne se montre ordinairement d'une manière distincte qu'après un délai de 5 jours; toutefois, après 7 jours, ces cultures montreront aussi, recouvrant la mousse, cette même couche épaisse de levure décrite plus haut. Peu à peu disparaît la mousse, et une partie de la levure tombe au fond; cependant, même après que ce dépôt s'est fait, on voit encore des masses épaisses de levure à la surface du liquide et contre les parois du verre. Comme nous l'avons vu, l'anneau de levure se forme aux premières phases de la fermentation, ce qui constitue un caractère de toute première importance pour la fermentation de levure haute.

Dans les mêmes conditions que celles que nous venons de décrire, la levure basse N° 1 de Carlsberg amène tout aussi vite la fermentation du liquide. En général, la mousse est formée de bulles plus grosses et elle est moins épaisse. Aux premières phases de la fermentation, on ne parvient pas à l'œil nu à découvrir de levure sur les bulles ou entre celles-ci; aussi un examen au microscope montre-t-il que la mousse ne renferme qu'un petit nombre de cellules. Par contre, avec cette levure les sécrétions du moût sont aussi abondantes que dans le cas de la levure haute; ces sécrétions, qui souvent sont de couleur brune, peuvent également se déposer contre les parois du verre et y former un anneau, mais, même dans cet anneau il n'y a que très peu de cellules. Comparé à celui des levures hautes, l'anneau des levures basses est très mince; vers la fin de la fermentation principale, les bulles éclatent, et les cercles se présentent alors sous la forme d'un voile sec et mince, dans lequel on peut remarquer des sécrétions provenant du moût, mais relativement peu de cellules de levure. A la surface du liquide, n'apparaissent pas non plus les masses de levure visibles à l'œil nu comme il y en a dans la fermentation haute. L'anneau visqueux sur les parois du verre et les épaisses couches de levure visqueuses à la surface font également défaut.

Dans les conditions de culture telles que nous les avons décrites, on remarque donc une différence assez frappante entre les deux phénomènes. Quiconque voudra faire des expériences de ce genre, devra d'abord faire une expérience préalable, comme celle qu'on vient de lire. J'en ai fait non seulement avec les

deux espèces susnommées, mais encore avec la plupart des autres espèces de levure haute et de levure basse dont j'ai parlé dans mes écrits et, de plus, avec la «Rasse II» de l'«Institut für Gärungsgewerbe» de Berlin, avec une espèce employée dans les brasseries danoises à fermentation haute et avec une levure haute de la brasserie Guinness à Dublin. Les caractères indiqués plus haut, caractères que la pratique industrielle nous a fait connaître, se reproduisirent, à l'exception près que, chez quelques-une des levures expérimentées, ils se montrèrent un peu moins vite et moins marqués. Il arrive parfois que plusieurs cultures sont nécessaires avant de pouvoir obtenir une fermentation haute manifeste. Quant aux caractères microscopiques, auxquels plusieurs auteurs attachent une grande importance, ils ont montré peu de solidité. — J'approfondirai davantage ces faits ainsi que différents autres dans un mémoire détaillé que j'ai l'intention de faire paraître plus tard.

Comme on peut s'en souvenir, la variation chez la levure basse N° 2 de Carlsberg susmentionnée se produisit dans de telles conditions qu'il était naturel de penser que la température basse (à peu près $^1/_2$ ° C.) y avait contribué. Ce fut cette remarque qui forma le point de départ de mes nouvelles expériences. Dans les brasseries Vieux-Carlsberg et Nouveau-Carlsberg, on a donné le nom de levure basse N° 2 à plusieurs espèces de levure de bière que, avec le temps, j'ai introduites dans ces brasseries. Toutefois, cette espèce n'existe plus, et c'est pourquoi j'en choisis une autre parmi les levures basses déjà citées, levures qui, en tout cas pendant un certain temps, pouvaient montrer des phénomènes de fermentation haute, ainsi que mes observations précitées l'ont démontré. Je cultivai de cette espèce, Saccharomyces turbidans (Syn. Sacch. ellipsoïdeus II), une végétation jeune et vigoureuse, qui montra des phénomènes de fermentation basse. Une faible dose de cette levure fut introduite dans un flacon Freudenreich contenant une mince couche de moût de bière, et déposé à une température de $^1/_2$ ° C. Après être restées ainsi pendant 3 et 5 mois, ces cultures furent examinées. Aucune trace de développement visible à l'œil nu ne pouvait se remarquer; cependant, au microscope, on pouvait constater avec certitude qu'une multiplication — faible, il est vrai — s'était produite. Des échantillons moyens provenant d'ensemencements amenés des flacons Freudenreich dans les éprou-

vettes remplies de moût dont nous avons parlé, redonnèrent constamment des phénomènes manifestes de fermentation haute, et je dus conclure que toutes les cellules, ou en tout cas le plus grand nombre, étaient devenues des cellules de levure haute, par ce que des essais faits avec 150 cellules ne pouvaient montrer une seule cellule donnant une fermentation basse. La question se posait maintenant de savoir si les cellules avaient subi une transformation pendant leur séjour à une température si près de 0.

Pour éclaircir cette question, je commençai à analyser la végétation qui avait servi pour la culture à $^1/_2{}^0$ C. Une expérience faite sur 100 cellules montra que la moitié de celles-ci avaient produit une fermentation haute, et l'autre moitié une fermentation basse. Comme pour la première expérience, on prit une partie de chacune de ces deux catégories de levure, qu'on distribua dans une série de flacons contenant de minces couches de moût et placés à cette même température basse. Le résultat de cette expérience fut que, après un délai de 3 à 4 mois, il n'était pas possible de découvrir des traces de multiplication dans les flacons contenant les cellules de levure basse, tandis que dans ceux renfermant les cellules de levure haute, la multiplication s'y voyait distinctement. Le contenu des deux catégories de flacons passa alors dans des éprouvettes pour y être cultivé; la première catégorie redonna une fermentation basse, la seconde, une fermentation haute manifeste. En conséquence, seule une sélection des cellules s'est faite dans cette expérience; de transformation, il ne s'en est pas produit.

Lorsque, en 1883, je donnais une description du Sacch. turbidans, ce champignon était une levure basse. La végétation avec laquelle les expériences ci-dessus décrites furent faites, provenait d'une culture de moût qui était restée quelque temps au laboratoire. D'autres vieilles cultures de cette espèce contenaient de même aussi une grande quantité de cellules de levure haute. Ces deux catégories avaient été cultivées à l'état de pureté pendant près d'un an. Pendant ce laps de temps, de nombreuses générations avaient été engendrées. Les végétations de levure haute restèrent de la levure haute, et les végétations de levure basse, de la levure basse. On isola dans des éprouvettes 1000 cellules d'une de ces végétations de levure haute: toutes donnèrent une fermentation haute. Un essai analogue fait

avec une des végétations de levure basse donna tout à fait le même résultat: toutes les cellules, examinées une à une, se montrèrent comme étant des cellules de levure basse. Jusqu'à présent, ces deux catégories se sont montrées constantes, même lorsque la culture des cellules de levure basse se faisait dans des conditions tendant à provoquer des phénomènes de fermentation haute, et que les cellules de levure haute étaient cultivées dans des conditions favorisant la formation de phénomènes de fermentation basse.

Depuis plusieurs années déjà, j'avais remarqué chez l'espèce décrite plus haut des variations qui la faisaient se rapprocher de la fermentation haute. C'est pourquoi, pour ma deuxième expérience, je choisis précisément une espèce chez laquelle ces variations n'avaient pas été observées et qui est généralement regardée comme étant une forme typique de levure basse, à savoir, le champignon de levure de vin, dit Johannisberg II, examiné pour la première fois et sous divers points de vue par Aderhold et Wortmann. Dans mes écrits se trouvent aussi à plusieurs endroits des communications concernant des expériences faites par moi sur ce champignon. Pour ces expériences, je pris de vieilles cultures comme point de départ, suivant en cela les expériences faites avec le Sacch. turbidans, expériences que j'ai relatées plus haut. Je pus constater qu'il n'était pas rare de trouver dans les végétations provenant de ces cultures plus de 70 % de cellules de levure haute. Dans la plupart des cas, les phénomènes de fermentation haute ne se produisaient pas d'une façon aussi marquée qu'avec le Sacch. turbidans, mais ils étaient cependant suffisamment nets. J'isolai également du Johannisberg II des cellules à fermentation haute et des cellules à fermentation basse, cellules dont les végétations restèrent constantes à travers de nombreuses cultures, qui quelquefois se continuèrent six mois durant. De cette espèce, on prit également 1000 cellules d'une végétation de chacune de ces deux catégories, et avec chacune de ces cellules, on fit des essais de fermentation. Vérification faite, la végétation de levure basse ne contenait que des cellules de levure basse, la végétation de levure haute, seulement des cellules de levure haute, résultat qui, par conséquent, répondait à celui que mon expérience sur le Sacch. turbidans avait donné.

Le mouvement qui fait passer une levure de fermentation

basse en une levure de fermentation haute, paraît s'opérer plus facilement que le mouvement contraire; du moins, mes recherches à ce jour semblent-elles l'indiquer. Je vais maintenant rendre compte de quelques expériences faites avec le Sacch. validus (Syn. Sacch. Past. III.). On sait que de tout temps cette espèce a été regardée comme étant une forme typique de levure haute. Un certain nombre de végétations, des jeunes et des vieilles, furent soumises à une analyse minutieuse, mais je ne trouvai des cellules de levure basse que dans une seule végétation, et encore n'y en avait-il que 3 sur 100. Les végétations qui en provinrent furent soumises dans le courant de deux années à de nombreuses cultures dans des conditions qui auraient dû favoriser l'apparition de phénomènes de fermentation haute, mais malgré cela, elles se comportèrent durant tout ce temps comme des levures basses.

Les expériences effectuées avec ces trois espèces de levure et que je viens de décrire, ont toutes porté sur des cellules de levure de depôt. Les expériences faites avec des cellules provenant de leurs voiles montrèrent que les cellules de levure basse forment un voile qui provoque à son tour une fermentation basse, et que les cellules de levure haute en forment un qui produit à son tour une fermentation haute. Quant à la manière dont les spores se comportent vis-à-vis du mouvement de variation traité dans ce mémoire, je ne pourrai m'expliquer sur cette question que dans le prochain.

Pour les analyses présentement décrites, mes aides au Laboratoire, M. M. Klöcker et Schiönning, m'ont donné un concours précieux, pour lequel je leur en exprime encore ici mes remerciements.

La question principale posée au commencement du présent mémoire, à savoir si les deux types physiologiques, la levure haute et la levure basse, sont indépendants l'un de l'autre, ou, si l'un d'eux peut se développer de l'autre, cette question, dis-je, a donc été résolue dans ce sens, que c'est le dernier cas qui se produit. Dans une culture pure de levure basse, il peut se former des cellules de levure haute, de même que dans une culture de levure haute, il peut se former des cellules de levure basse. Ces deux types dans lesquels l'espèce se divise ainsi, peuvent vivre longtemps côte à côte dans un même milieu nutritif. Ordinairement, un

des types prend le dessus, ce qui fait que l'espèce a l'air d'être formée uniquement de ce type. Le cas peut aussi se produire où un type seul est présent: nous avons alors ou une levure haute pure ou une levure basse pure. Les différentes catégories de l'espèce se combattent continuellement; ce fait s'applique aussi au cas particulier. Nous avons vu plus haut, dans nos expériences faites à $^1/_2{}^0$ C. avec le Sacch. turbidans, comment la levure haute se répandait aux dépens de la levure basse et finalement arrivait à la supprimer. Cela ne veut pas dire que ce soit cette température de $^1/_2{}^0$ C. qui ait formé une séparation entre ces deux types; car, en réalité, elle se rapproche de très près de la température minima exigée pour leur multiplication à tous deux; seulement elle est un peu moins défavorable à la fermentation haute qu'à la fermentation basse.

Quant aux facteurs qui ont déterminé l'apparition des variations qui viennent d'être décrites, je ne suis pas encore à même de communiquer quelque chose de positif à ce sujet. Pour le moment, au point où nous en sommes par rapport à ce phénomène, on doit plutôt le rapporter au groupe de variations que, ces derniers temps, Hugo de Vries a désignées sous le nom de *mutations*. Si nous voulions également cataloguer les deux autres phénomènes de variation dont nous avons parlé, à savoir le changement de la forme et du pouvoir de sporulation des cellules qui se produit subitement et sans cause connue, nous devrions probablement aussi les ranger dans ce même groupe.

L'asporogénité peut aussi se produire sous l'influence de températures élevées; dans ce cas, ainsi que je l'ai démontré, il y a un facteur extérieur déterminé qui agit, et il en résulte une transformation. A l'heure actuelle, il règne une disposition à considérer toute variété comme étant une mutante, pour peu qu'elle se montre constante. Les variétés asporogènes du Saccharomyces obtenues en traitant les cellules à une température élevée, ont été considérées par quelques auteurs comme des mutantes. Une pareille interprétation n'est cependant pas juste pour cette variation-ci, vu qu'elle se produit sous l'influence d'un facteur extérieur déterminé et ce, dans chaque cellule.

Ce fait, je l'ai constaté par le dispositif même de mes expériences concernant cette variation: J'étais parti non seulement d'une cellule végétative ou d'une spore prises au hazard, mais aussi d'une cellule ou d'une spore qui fondaient une végétation

dans laquelle on ne voyait pas le moindre signe indiquant une formation de cellules asporogènes. Les cellules asporogènes qui apparurent après le traitement devaient naturellement et précisément avoir été provoquées par ce traitement même. Il est aussi à remarquer que la variété asporogène constante n'apparut pas tout de suite, comme le font les mutantes, mais qu'elle se forma peu à peu. Enfin, nous devons de nouveau faire remarquer que la variation peut s'opérer sûrement avec chaque cellule, n'importe de laquelle on soit parti. Bref, cette variation montre tous les caractères distinctifs de la transformation. D'ailleurs, je renvoie mes lecteurs à mon mémoire déjà cité, paru en 1889, de même que, pour les méthodes, au mémoire détaillé publié dans les Comptes-rendus des trav. du Laboratoire de Carlsberg, **5** (1900).

D'un seul côté, l'idée a été émise que le défaut de sporulation devait probablement être dû à un affaiblissement provisoire. A cette manière de voir, nous pouvons notamment opposer que les cellules sont douées d'un pouvoir très actif de multiplication, et que même après 17 ans elles se sont encore montrées d'une façon constante asporogènes. Une transformation peut d'ailleurs se manifester tout aussi bien par la perte d'une propriété que par l'acquisition d'une nouvelle.

Afin d'éviter tout malentendu, je dois ajouter ici que ma manière de voir a fini par rencontrer plus d'adhérents que d'adversaires.

Les attaques dirigées contre mes recherches sur la variation et l'hérédité peuvent, en partie du moins, être rapportées au fait qu'on les a confondues avec celles qui ont été faites sur le Bacillus anthracis. Jusqu'à présent, je n'ai pas répondu à ces attaques, mais je saisis maintenant l'occasion de les réfuter. Les collaborateurs de Pasteur, M. M. Chamberland et Roux, furent, comme on le sait, les premiers qui démontrèrent que ledit bacille peut perdre son pouvoir de former des spores, en tout cas à travers quelques générations, lorsque les cellules sont exposées à l'influence de l'acide phénique ou du bichromate de potasse. Ayant pu constater plus tard que le procédé ne pouvait donner aucune certitude, Phisalix employa ma méthode et obtint ainsi une variété asporogène qui se maintint dans des conditions de culture particulières. La méthode de Chamberland-Roux différait ainsi totalement de la mienne, et Phisalix, qui a bien adopté ma méthode, l'a appliquée à un microorganisme

qui appartient à un tout autre groupe que le genre Saccharomyces. Aussi le résultat n'a-t-il été le même qu'en partie: l'hrisalix n'est pas arrivé à une constance parfaite, et il semble aussi que dans son expérience ce soit plutôt un affaiblissement qui s'est produit. Les savants français et leurs successeurs n'ont pas eu d'autre but que celui de montrer que le Bacillus anthracis pouvait se montrer comme une variété asporogène, et leurs recherches ne donnent pas le moindre renseignement au sujet de la question de savoir si c'est une transformation qui a lieu ou seulement une sélection en faveur des cellules asporogènes se trouvant déjà dans la végétation cultivée; somme toute, ils ne posèrent même pas du tout la question. A ce point de vue, il y a donc une différence essentielle entre mes essais sur les espèces de Saccharomyces et ceux des savants susnommés sur le Bacillus anthracis.

Copenhague, Laboratoire de Carlsberg, août 1905.

LEVURE HAUTE ET LEVURE BASSE.

ETUDES SUR LA VARIATION ET L'HÉRÉDITÉ.

DEUXIÈME PARTIE.

(Centralbl. f. Bakt., Par. u. Infektionsk., 2. Abt. B. XVIII. 1907).

PAR

EMIL CHR. HANSEN.

DANS mon premier compte rendu sur ce sujet (Centralbl. f. Bakt. etc., 2. Abt., **15,** 353 (1905)), j'ai indiqué comment je fus amené à faire ces études, et j'ai exposé en même temps mes travaux préliminaires et mes méthodes.

Au sujet de celles-ci, j'ai à faire quelques remarques. En parlant des éprouvettes aux bouchons rodés à l'émeri, j'aurais dû faire remarquer expressément qu'elles ne peuvent être employées pour les essais en question que lorsque le tube du bouchon et le coton qui le remplit sont placés de manière à ce que l'air puisse y arriver très largement. D'ailleurs, tant pour les essais décrits dans mon premier compte rendu que pour ceux qui vont l'être dans le présent mémoire, je me servis des éprouvettes décrites dans celui-là, bouchées avec du coton et recouvertes de capsules ne joignant pas entièrement.

Quand les végétations prises sur les taches de levure se trouvant sur le moût gélatinisé des cultures sur plaques se composent principalement ou exclusivemeut de cellules de levure haute, elles montreront aussi la plupart du temps une fermentation haute manifeste déjà à la première ou la seconde culture en éprouvette dans du moût. Exceptionnellement, il peut cependant arriver que pour provoquer ledit phénomène il faille continuer à travers 3 ou 4 cultures en éprouvette. Par la désignation levure basse, j'entends une végétation qui s'est maintenue comme telle à travers 4 cultures en éprouvette. Dans des cas spéciaux, la culture fut encore prolongée, parfois des mois durant, ce qui

alors est mentionné chaque fois que cette prolongation de culture a eu lieu.

Pour tous ces essais, le point de départ fut des cultures pures provenant de cellules uniques et préparées sous le microscope dans une chambre humide. On procéda à l'isolement des cellules de ces cultures, et à cause de la grande quantité d'analyses à faire, on dut employer les cultures sur plaques ordinaires (répartition sur du moût gélatiné). On eut naturellement toujours soin de faire en sorte que les échantillons pris pour ces analyses fussent des échantillons moyens. On sait par mes recherches sur les méthodes de culture à l'état de pureté, que parmi les taches de levure qui se développent sur ces plaques, il y en a qui ne sont pas formées d'une seule cellule chacune, mais de plusieurs (Comptes-rendus des trav. du Laboratoire de Carlsberg **2** (1883)). En moyenne, Holm trouva dans ses essais faits avec de la levure du commencement de la fermentation, que 110 cellules avaient formé 100 colonies, et dans ceux faits avec la levure de la fin de la fermentation, 100 colonies s'étaient formées de 107 cellules (*loc. cit.* **3** (1892)).

Le fait de regarder chaque tache de levure comme étant le produit d'une seule cellule est une erreur qui ne peut avoir aucune importance au cas particulier. En effet, comme nous l'avons fait remarquer plus haut, ce sont des cultures pures parfaitement sûres provenant de cellules uniques qui forment le point de départ, et le résultat de chaque série d'analyses peut ainsi être rapporté à chaque cellule; en outre, au cours de cette série d'analyses, — chaque fois qu'il nous a paru nécessaire de le faire, — on a de nouveau intercalé, pour servir de point de départ à l'essai suivant, une nouvelle culture provenant de cellule unique et dont la pureté avait été vérifiée sous le microscope.

On peut se rappeler que les expériences décrites dans mon premier compte rendu ont eu pour résultat principal le fait que les deux types physiologiques, la levure haute et la levure basse, ne sont pas indépendants l'un de l'autre, mais que l'un d'eux peut se développer de l'autre. Une seule cellule peut fonder une végétation composée de ces deux formes. Les deux types dans lesquels l'espèce se scinde peuvent vivre longtemps côte à côte dans le même liquide nutritif, et dans la concurrence qui se fait entre eux, un des deux types prendra ordinairement le dessus et donnera en conséquence à la végétation son cachet

propre, de manière à faire croire que la végétation ne se compose uniquement que de ce seul type, tandis que, en réalité, elle les renferme tous les deux, soit donc aussi bien des cellules de levure haute que des cellules de levure basse. Il fut en outre démontré que ces deux types, cultivés en cultures pures pendant des mois entiers, pouvaient montrer, chacun de son côté, un haut degré de constance dans le sens mentionné par rapport au contenu des cellules, de sorte que la levure haute ne donnait régulièrement que des végétations de levure haute, et la levure basse seulement des végétations de levure basse, dans chacune desquelles il ne se trouvait qu'une seule catégorie de cellules, soit seulement des cellules de levure haute ou seulement des cellules de levure basse.

Peu de temps après la publication de mon premier mémoire sur cette question, Regensburger fit paraître une recherche approfondie qu'il avait faite sur trois espèces de levure haute de bière (Centralbl. f. Bakt. etc. 2. Abt. **16,** 289 (1906)). Cet article attira mon attention sur un travail de Will qui malheureusement m'avait échappé lors de ma première communication. En 1897, en parlant de certaines questions techniques (Zeitschr. f. d. gesamte Brauwesen, **20,** 603), il dit que quelques-unes des levures pures de bière basse de la Station de Munich qui avaient rendu de bons services dans la pratique industrielle pendant plusieurs années (il y en avait même une qui était cultivée depuis 1884 avec un bon résultat), commençaient à montrer des irrégularités, parmi lesquelles était celle que la levure commençait à monter à la surface. De plus, Will avait reçu d'un de ses anciens élèves la communication que lui aussi avait observé ce phénomène, mais seulement lors des premières fermentations après l'introduction d'une culture pure dans la brasserie. Mais lorsque, de fermentation en fermentation, la levure qui se trouvait au fond fut employée à l'ensemencement, la troisième fermentation déjà se passa normalement la plupart du temps, et, à la suivante, on était déjà sûr d'obtenir une levure satisfaisante. On n'approfondit pas davantage ce cas anormal. Il s'agit ici d'observations analogues à celles que j'avais décrites quelques années auparavant et reproduites dans mon premier mémoire sur les recherches qui nous occupent. En 1897, la manière de voir de Will — que d'ailleurs il avait encore lorsque plus tard il s'exprima sur cette question — était que la levure basse ne se transforme pas en levure haute, et que la transformation contraire ne

se fait également pas. Pendant plusieurs années, mes essais de culture sur des espèces de levure haute à la température de la fermentation basse et ceux sur des levures basses à la température de fermentation haute, n'avaient pas provoqué de transformation dans ce sens. Ce résultat contribua aussi pour sa part à faire admettre généralement que la levure haute et la levure basse étaient deux groupes tout à fait distincts, ne pouvant pas se développer l'un de l'autre. Personne ne pensait, à cette époque-là, à entreprendre des recherches pouvant amener la solution de cette question. Pour moi, j'avais aussi cette manière de voir jusqu'à ce que, il y a 2 ans, je publiai les résultats de mes expériences et de mes analyses. Pour ce qui concerne les fermentations anormales dans les brasseries de fermentation basse, Regensburger estime que, si l'on faisait des recherches plus approfondies, elles pourraient peut-être apparaître comme des phénomènes ayant seulement une analogie avec la fermentation haute, phénomènes provoqués par une composition particulière du liquide nutritif, mais dont nous ne savons encore rien. Et ailleurs, au cours de la polémique à laquelle donnèrent lieu mes nouvelles recherches, on émit également l'avis qu'il n'est pas du tout nécessaire d'admettre que lesdites fermentations anormales des brasseries à fermentation basse soient réellement des fermentations hautes. Donc, il existe toujours une disposition marquée à regarder les types de levure haute et ceux de levure basse comme des types indépendants. Des recherches offrant de pareilles difficultés doivent d'abord avoir atteint, au laboratoire, un certain point avant de pouvoir fournir une explication bien fondée des phénomènes se présentant dans la pratique industrielle. En conséquence, c'est seulement du côté théorique de la question que je m'occuperai provisoirement dans ces études et ces analyses.

En citant mes travaux, le Dr Regensburger ne renvoie pas le lecteur aux mémoires originaux parus en danois et en français dans les Comptes-rendus des trav. du Laboratoire de Carlsberg, mais aux traductions qui en ont été faites dans la »Zeitschrift f. d. ges. Brauwesen«, qui non seulement sont incomplètes, mais — ce qui est pire encore — qui renferment à plusieurs endroits plus d'une méprise et de nombreuses erreurs[1]).

[1]) A la suite de mes études susmentionnées, on me demanda de divers côtés d'envoyer des échantillons des deux types de levure haute et basse dans lesquels les espèces servant à mes expériences s'étaient scindées. C'est ainsi

Dans ces recherches, il faut distinguer deux cas principaux: Ou la végétation provenant d'une cellule unique se composera de cellules d'un seul et même type, soit exclusivement de cellules de levure haute ou exclusivement de cellules de levure basse; ou bien elle renfermera et des cellules de levure haute et des cellules de levure basse, et son contenu est alors hétérotypique. Dans le premier cas, nous aurons un type simple, dans le dernier, un type mixte. Mes nouvelles expériences, dont je vais maintenant rendre compte, feront mieux comprendre ces phénomènes. Cette étude traitera tout particulièrement du type mixte, et les expériences ne comprendront pas seulement les végétations provenant de cellules végétatives (levure de dépôt et levure de voile), comme il en a été le cas dans mon premier compte rendu sur cette question, elles comprendront aussi les végétations provenant de spores. En outre des trois espèces mentionnées dans ma première étude, le Johannisberg II, le Sacch. turbidans (Syn. S. ellipsoïdeus II) et le Sacch. validus (Syn. S. Pastorianus III), mes expériences se sont étendues au Sacch. cerevisiæ (Syn. S. cerevisiæ I) ainsi qu'à une autre levure de brasserie à fermentation haute et aux deux espèces de levure basse de brasserie, les levures basses N°s 1 et 2 de Carlsberg.

Levure de vin, Johannisberg II.

Les chiffres suivants fournissent des exemples de mes analyses du type mixte chez le Johannisberg II. Une cellule végétative fonda une végétation qui, à travers de nombreuses cultures, donna de la fermentation basse. 1000 cellules en furent ensuite isolées pour être analysées.

984 donnèrent une fermentation basse.

16 donnèrent une fermentation intermédiaire.

Par une fermentation intermédiaire, nous entendons une fer-

---

que les matériaux d'essais les plus importants ont été envoyés au Laboratoire bactériologique du Dr Král à Prague, où on peut s'adresser en tout temps pour avoir de ces échantillons, ainsi que généralement tous les organismes de fermentation mentionnés particulièrement dans mes écrits.

[1]) Pour ce qui concerne les nouveaux noms, voir mon mémoire: »Lignes fondamentales pour servir à la classification des Saccharomycètes.« Je ferai paraître prochainement un mémoire sur les espèces de levure de brasserie à fermentation basse; ce mémoire sera publié dans les Comptes-rendus du Laboratoire de Carlsberg.

mentation tenant à peu près le milieu entre la fermentation haute et la fermentation basse; elle est nettement distincte d'une fermentation basse et se rapproche plus ou moins d'une fermentation haute, sans toutefois en avoir tout à fait l'aspect.

Des 16 végétations de fermentation intermédiaire, 2 furent isolées pour être analysées ultérieurement; nous les désignerons par A et B.

Sur 100 cellules de la végétation A,

5 donnèrent une fermentation haute,
55, une fermentation intermédiaire,
40, une fermentation basse.

Sur 100 cellules de la végétation B,

34 donnèrent une fermentation intermédiaire,
66, une fermentation basse.

Ainsi donc, les végétations analysées montrèrent les trois genres de fermentation; toutefois, la fermentation basse a toujours prédominé sur la fermentation haute.

Une série d'analyses correspondantes fut faite sur une cellule végétative provenant de l'une des végétations à fermentation haute qui avait été isolée du Johannisberg II et était en train de faire un mouvement de variation vers la fermentation haute.

Sur 100 cellules,

78 donnèrent une fermentation haute,
9, une fermentation intermédiaire,
13, une fermentation basse.

Le résultat principal ressemble à celui de la série précédente; mais comme c'était une végétation à fermentation haute qui avait formé le point de départ, l'analyse montre aussi qu'il y a une tendance marquée dans ce sens.

Une des 78 végétations à fermentation haute fut soumise à une analyse ultérieure.

Sur 100 cellules,

90 donnèrent une fermentation haute,
9, une fermentation intermédiaire,
1, une fermentation basse.

Dans la végétation analysée en dernier lieu, le mouvement vers la fermentation haute est encore plus accusé que dans l'analyse précédente. En continuant à isoler des cellules des végétations à fermentation haute, nous finirions sans doute par trouver un type simple de fermentation haute. La possibilité de pouvoir

trouver un type simple de fermentation basse dans la végétation du point de départ n'est également pas exclue, encore que ce cas ne puisse pas se présenter souvent. Ce que nous disons ici s'applique aussi à la série précédente, en remplaçant le mot de fermentation haute par fermentation basse, et celui de fermentation basse par fermentation haute.

Les essais relatés jusqu'ici ont été faits sur des cellules végétatives: cellules de dépôt et cellules de voile. Ainsi que je l'ai déjà démontré dans mon premier mémoire, les cellules de voile se comportent comme les cellules de levure de dépôt dont elles sont issues. Je vais maintenant passer à la description de mes expériences sur les spores. Il s'agit toujours du Johannisberg II. Dans quelques cas, les analyses se firent sur des cultures parties de cellules uniques, dans d'autres, sur des cultures en masses.

A ces premières, les chiffres suivants pourront servir d'exemples: Ils concernent une analyse dont le point de départ fut une spore qui avait fondé une végétation à fermentation haute. Sur 1000 cellules de cette végétation,

997 donnèrent une fermentation haute,
2, une fermentation intermédiaire,
1, une fermentation basse.

Celle-ci conserva son caractère de fermentation basse même après une culture de plusieurs mois, et même l'analyse la plus minutieuse ne put y faire découvrir une seule cellule à fermentation haute. La première fois, on analysa 1000 cellules; plus tard, on en analysa encore 200.

Une deuxième expérience fut faite de la même manière sur une spore qui avait fondé une végétation de fermentation basse. Dans ses points essentiels, le résultat fut le même que dans l'expérience précédente, avec la seule différence que le développement, — comme on pouvait s'y attendre, — se porta vers la fermentation basse. Dans les deux cas précédents, les spores qui avaient servi aux expériences, provenaient de types mixtes. Toutefois, il n'y a aucun doute qu'une végétation qui se présente comme type simple ne donne ordinairement des spores dont chacune reproduira ce type simple. En tout cas, c'est ce que mes expériences avec des spores ensemencées en masse ont fait supposer.

Pour des expériences comme celles dont il s'agit, il convient, pour les analyses, d'employer des cultures en masse toutes

les fois que cela est possible. Afin d'être bien assuré d'avoir des cultures pures de spores en masse, il faut avoir soin de faire périr dans chaque culture de spores les cellules végétatives qui y apparaissent, et il faut que cela se fasse d'une telle manière que le pouvoir germinatif des spores ne s'en ressente pas trop. Dans un prochain memoire sur l'action destructive de l'alcool éthylique sur les bacteries et les levures, je donnerai des renseignements sur la methode à employer pour détruire ces cellules. Comme ces recherches se rapportent à une série de travaux dûs en grande partie à de savants médecins, et comme elles fournissent en même temps un apport au traitement de l'eczéma, elles seront publiees dans la première division de la »Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenkunde, etc.«. Les spores qui avaient pris naissance dans une vegetation de levure basse reproduisirent des végétations à fermentation basse, de même que les spores d'une végétation de levure haute redonnèrent des végétations de fermentation haute; dans les quelques cas très rares où j'observai une exception à cette règle, la cause en était que le point de départ avait été un type mixte.

Une question importante est celle de savoir si ce que dans mes analyses je désigne sous le nom de fermentation intermédiaire, se produit par le fait que les cellules de cette fermentation sont une chose intermédiaire entre les cellules de fermentation haute et celles de fermentation basse et que chacune en particulier développe des végétations produisant une fermentation haute faible, ou bien, si cette fermentation intermédiaire est due à ce qu'il s'y trouve un mélange de cellules de fermentation haute et de fermentation basse; en d'autres termes, il s'agit de savoir si nous avons à faire avec 2 ou bien 3 catégories de cellules. Je n'ai pu en trouver que deux, à savoir une catégorie de fermentation haute et une catégorie de fermentation basse. Tous les échantillons de fermentation intermédiaire examinés ont toujours montré et des cellules de fermentation haute et des cellules de fermentation basse; il ne m'a pas été possible d'observer un type simple d'une forme intermédiaire quelconque. La fermentation intermédiaire se produit en tout cas le plus souvent par le fait que, dans la végétation, il se forme aussi bien des cellules de levure haute que des cellules de levure basse.

De ce que, malgré de nombreuses analyses, je n'ai pas été

à même de trouver un type simple de fermentation intermédiaire chez l'espèce en question, il n'en faut naturellement pas conclure que la possibilité d'en trouver un chez une autre espèce est exclue. J'ai fait remarquer précédemment que les espèces de levure haute de brasserie, voire même des espèces typiques, montrent le phénomène de fermentation haute à un degré plus ou moins fort. Et même si nous nous plaçons à ce point de vue, nous trouvons aussi toute une gradation chez les espèces, en sorte qu'on pourrait encore ici parler de formes intermédiaires; seulement cette désignation devrait alors être prise dans un autre sens que celui dont il est parlé plus haut.

En comparant les résultats de nos analyses du Johannisberg II, nous pouvons constater que, généralement, cette espèce montre le caractère d'une levure basse. Une de ses cellules peut former une végétation homogène, constituée soit par des cellules de levure haute, soit par des cellules de levure basse, et cette végétation est ainsi un type simple; ou bien, cette même cellule peut former une végétation ayant un mouvement de variation et composée tant de cellules de levure haute que de cellules de levure basse, de sorte que la végétation représente alors un type mixte. La proportion dans laquelle ces deux catégories de cellules sont représentées dans le type mixte peut varier beaucoup. La règle est que la tendance à varier que présente la cellule-mère en formant soit une levure haute pure ou une levure basse pure, se retrouve chez les cellules auxquelles elle donne naissance; toutefois, quelques-unes d'entre elles peuvent, ainsi que nous l'avons vu, prendre une direction opposée et s'y maintenir constantes, c'est-à-dire que, dans ces cas-là, un type mixte peut produire un type simple. Il n'existe probablement pas de type simple au sens strict du mot, mais il peut bien se faire qu'on en trouve un chez lequel le mouvement de variation a cessé provisoirement. Comme les conditions de culture étaient identiques dans tous les cas mentionnés, nous devons en conclure que le fait que des cultures tout à fait pareilles et issues toutes d'une cellule unique peuvent produire tantôt exclusivement des cellules de levure haute, tantôt, au contraire, seulement des cellules de levure basse, et tantôt aussi un mélange des deux genres de cellules, doit nécessairement nous faire en chercher la cause dans la cellule même. Ici nous ne trouvons absolument rien qui puisse indiquer une influence extérieure. Tout ce que nous avons

dit ci-dessus des cellules végétatives, cellules de levure de dépôt et cellules de voile, s'applique aussi aux spores. Celles-ci se comportent de la même manière que leur origine végétative. Les chiffres que nous avons donnés précédemment nous donnent une idée de la composition des végétations ainsi que des lignes principales des mouvements de variation.

Saccharomyces turbidans.

Bien que les analyses qui ont été faites du Saccharomyces turbidans ne puissent pas, quant au nombre, être comparées avec celles auxquelles le Johannisberg II a été soumis, elles montrent assez distinctement que les résultats principaux mentionnés ci-dessus s'appliquent aussi à cette espèce-là.

Deux espèces de levure basse de brasserie.

Les recherches sur les espèces de levure basse de brasserie furent faites en partie avec une race de la levure basse N° 1 de Carlsberg qui, dans quelques points, s'écarte de la forme typique de cette espèce, — et, en partie aussi, avec une des espèces que j'avais également introduites dans les brasseries de Carlsberg sous la désignation commune de levure basse N° 2 de Carlsberg et qui furent employées pendant quelque temps à fabriquer des bières moins fermentées que celles produites avec la levure basse N° 1 de Carlsberg. Celle-ci avait été prélevée sur l'appareil propagateur de la levure de la brasserie du Nouveau-Carlsberg et, par le fait même, du levain industriel même; la levure basse N° 2 de Carlsberg, par contre, provenait d'une culture vieille de 16 ans conservée dans une solution contenant 10% de saccharose. Comme point de départ pour les analyses, nous employâmes, comme d'habitude, des cultures provenant de cellules uniques.

On isola 200 cellules de la levure basse N° 1 de Carlsberg, dont

7 donnèrent une fermentation intermédiaire,
193, une fermentation basse.

Des végétations de la fermentation intermédiaire, on en soumit une à une nouvelle analyse.

Sur 200 cellules,

27 donnèrent une fermentation haute,
149, une fermentation intermédiaire,
24, une fermentation basse.

Sur 200 cellules de la levure basse N° 2 de Carlsberg,
10 donnèrent une fermentation intermédiaire,
190, une fermentation basse.

Une autre culture provenant d'une cellule unique de cette même espèce, donna un résultat analogue dans ses points essentiels.

Une des 10 végétations à fermentation intermédiaire ayant été de nouveau divisée dans ses parties, sur 200 cellules,
2 donnèrent une fermentation haute,
11, une fermentation intermédiaire,
187, une fermentation basse.

Ainsi donc, les espèces de levure basse de brasserie analysées montrèrent toutes deux une tendance prédominante à former des cellules de levure basse. Quelques cellules toutefois s'étaient écartées sensiblement de la fermentation basse, et quelques-unes avaient même donné une fermentation haute distincte, bien que pas forte.

Saccharomyces validus.

Dans ma première communication j'ai dit que, ayant soumis à des expériences plusieurs végétations, — des jeunes et des vieilles, — de la levure haute sauvage Sacch. validus, je n'avais trouvé des cellules de levure basse que dans une seule végétation, et encore ces cellules n'étaient-elles qu'au nombre de 3 sur 100. Ce résultat d'ailleurs était dû à un pur hasard, car une analyse ultérieure de 1529 cellules ne permit pas de constater la présence d'une seule cellule de levure basse et, lorsque dernièrement ces 3 végétations de levure basse furent de nouveau disséminées, elles se montrèrent comme de véritables types mixtes, quoique ayant une tendance prononcée à la fermentation basse. Du fait que de telles végétations engendrent en majeure partie des cellules de levure basse, les fermentations ont l'air d'être des fermentations basses pures, mais, en réalité, elles ne le sont cependant pas. Je n'ai pas encore pu trouver de type simple de levure basse chez cette espèce. Pour ces expériences, le point de départ fut des végétations de levure de dépôt engendrées dans du moût; dans mes nouvelles expériences, les cellules de voile et de spores donnèrent aussi ce même résultat.

En somme, on n'observe que rarement chez les espèces typiques de levure haute un mouvement ayant pour effet de

changer la forme de levure haute en celle de levure basse. Afin de pouvoir se faire une idée des proportions existant entre ces deux catégories de cellules ainsi que de leurs mouvements de variation a l'egard des phénomènes de la fermentation haute et de la fermentation basse, on est ordinairement obligé de faire des analyses en nombre beaucoup plus grand que cela n'était nécessaire pour les levures basses.

Deux espèces de levure haute de brasserie.

Mes premières expériences sur le Sacch. cerevisiæ (Syn. Sacch. cerevisiæ I), levure haute provenant de brasseries de Londres et d'Edimbourg, furent faites avec une végétation jeune et vigoureuse qui avait été cultivée longtemps dans du moût souvent renouvelé, donc avec une végétation dont on pouvait être sûr que les cellules n'étaient pas vieilles.

Les 1000 cellules qui furent analysées développèrent toutes des végétations de levure haute.

Les analyses suivantes effectuées avec cette espèce le furent, par contre, avec deux végétations très vieilles, dont l'une était une culture de moût qui était restée 22 ans sans que le moût ait été renouvelé, et dont l'autre était une culture dans une solution de saccharose a 10 %, culture dont j'avais semé les cellules 21 ans auparavant et qui avait été conservée dans cette même solution durant tout ce temps.

100 cellules de la vieille culture en moût furent analysées sans avoir été préalablement cultivées dans du moût frais; elles donnèrent toutes une fermentation haute.

Pour une autre expérience, la même vieille culture de levure fut d'abord cultivée dans deux cultures dans du moût, et la végétation de jeunes cellules ainsi produite fut ensuite analysée.

Sur 223 cellules,

221 donnèrent une fermentation haute,

2, une fermentation basse.

Ces 2 dernieres végétations, l'une désignée par *a*, l'autre par *b*, furent soumises à une analyse ultérieure.

Sur 100 cellules *a*,

96 donnèrent une fermentation intermédiaire,

4, une fermentation basse.

Sur 100 cellules *b*,

4 donnèrent une fermentation haute,
84, une fermentation intermédiaire,
12, une fermentation basse.

De la végétation conservée dans la vieille culture de saccharose ci-dessus mentionnée, on analysa d'abord 100 cellules sans les avoir préalablement cultivées dans du moût; de ces 100 cellules,

96 donnèrent une fermentation haute,
4, une fermentation basse.

De ces 4 végétations de levure basse, on en prit *2*, *c* et *d*, pour les soumettre à une analyse ultérieure.

Sur 100 cellules *c*,

8 donnèrent une fermentation haute,
66, une fermentation intermédiaire,
26, une fermentation basse.

Sur 100 cellules *d*,

80 donnèrent une fermentation intermédiaire,
20, une fermentation basse.

On fit ensuite encore une analyse avec la même vieille végétation provenant de la culture de saccharose; mais, auparavant, elle passa par 2 cultures dans du moût. Des nouvelles cellules ainsi produites, on en analysa 1000, dont

998 donnèrent une fermentation haute,
1 donna une fermentation intermédiaire,
1, une fermentation basse.

De la végétation ayant donné une fermentation basse, on prit 100 cellules pour en faire une analyse ultérieure; de ces 100 cellules

8 donnèrent une fermentation haute,
88, une fermentation intermédiaire,
4, une fermentation basse.

Dans ces cas-ci, comme aussi dans quelques cas chez d'autres espèces, on a pu constater que de très vieilles végétations dans du moût ou de la saccharose peuvent renfermer quelques cellules s'écartant de la fermentation normale de l'espèce, — au cas particulier, de la fermentation haute, — tandis que dans les végétations jeunes, vigoureuses, engendrées dans du moût souvent renouvelé, un pareil écart ne s'est pas montré. Si nous comparons les analyses précédentes du Sacch. cerevisiæ, nous verrons que sur 2423 cellules, il n'y en eut que 7 qui donnèrent

une fermentation basse, et une analyse ultérieure des végétations fondées par les cellules ayant donné une fermentation basse montra qu'elles n'étaient que des types mixtes qui accusaient, il est vrai, une tendance distincte, bien que peu forte, à la fermentation basse.

Une autre levure haute de brasserie provenant de brasseries écossaises fit preuve d'une constance plus grande encore.

Comme, dans les analyses préliminaires, on n'avait pas pu constater dans les végétations de cette levure le moindre signe indiquant une formation de cellules de levure basse, il était évident qu'il fallait faire beaucoup plus d'analyses pour cette espèce que pour les autres, précédemment analysées; et, d'après ce qui a été dit de l'importance des vieilles végétations, il était utile d'en faire tout d'abord une analyse. La plus vieille végétation que je pus me procurer provenait d'une culture dans du moût ayant été conservé vingt mois au laboratoire.

Sur 2635 cellules de cette végétation, 2634 donnèrent une fermentation haute, 1 donna une fermentation basse.

Une analyse ultérieure montra que cette végétation de levure basse n'était qu'un type mixte avec une tendance à la fermentation basse.

3000 cellules d'une jeune végétation cultivée dans du moût fréquemment renouvelé, furent analysées: toutes donnèrent une fermentation haute.

Sur 5644 cellules, il n'y en a donc eu qu'une seule qui se soit écartée de la fermentation haute. Tel fut le résultat auquel aboutit un essai fait avec des cellules purement végétatives.

Pour une autre série d'expériences concernant cette espèce, ce furent les spores qui formèrent le point de départ. Ces spores fondèrent 4 végétations, dont on isola en tout 9948 cellules. Parmi ce grand nombre, il ne s'en trouva néanmoins qu'une seule qui n'appartenait pas au type de levure haute, et même celle-ci n'était-elle encore qu'un type mixte. Les végétations formées par les spores se sont donc comportées de la même manière que celles produites par les cellules végétatives. Sous ce point de vue, toutes les cellules de levure haute et toutes les cellules de levure basse qui ont été analysées, ont toutes donné le même résultat.

Pour ces nouvelles analyses, mes aides M. M. Klöcker et Schiönning m'ont aussi aidé de leur mieux.

C'est chez les espèces de levure basse qu'on a trouvé le plus fort mouvement de variation, et chez les levures hautes, l'hérédité la plus accusée. Les éclaircissements relatifs aux mouvements de variation et aux phénomènes d'hérédité qui se rencontrent chez les cellules du genre Saccharomyces, sont dûs principalement aux recherches faites sur les levures basses. Comme nous l'avons déjà vu, on s'est prononcé différemment sur les relations existant entre la levure haute et la levure basse, et on a prétendu, entre autres, que les levures hautes s'étaient développées des levures basses, de sorte que les espèces de levure basse représenteraient le type primaire, et les levures hautes le type secondaire. On a cherché à motiver cette manière de voir par le fait qu'on n'avait pas trouvé d'espèce de levure haute dans la nature, et aussi par ce qu'on croyait avoir démontré que, cultivées à une température élevée, les levures basses se transformaient en levures hautes. J'ai déjà eu antérieurement l'occasion d'établir que ces deux arguments ne tiennent pas bon. La cause principale de ces erreurs-là et d'autres pareilles est due à ce qu'on n'était pas encore à même d'opérer avec des cultures pures. Les résultats de mes expériences et, en particulier, la démonstration d'une constance aussi forte chez les levures hautes, pourraient plutôt faire croire que ce sont les levures hautes qui sont les plus anciennes dans la nature, et les levures basses, les plus jeunes, et que celles-ci se seraient développées des levures hautes. Quant aux facteurs qui provoquent ce mouvement de variation, je n'ai pas encore pu jusqu'à présent donner de renseignements satisfaisants. A ce point de vue, on peut donc dire des phénomènes qui ont été traités dans ce mémoire ce qu'on a dit de cette variation chez les Phanérogames que, d'après Hugo de Vries, on appelle ordinairement *mutation*, et ce qu'on a de mieux à faire, pour le moment du moins, c'est de les ranger dans cette catégorie-là.

Laboratoire de Carlsberg, Copenhague, février 1907.

DE L'ACTION DESTRUCTIVE DE L'ALCOOL ÉTHYLIQUE SUR LES BACTÉRIES ET LES LEVURES.

(Centralbl. f. Bakt., Par. u. Infekt., 1. Abt., Bd. XLV, 1907).

PAR

EMIL CHR. HANSEN.

La littérature médicale compte toute une série de travaux se rapportant à ce sujet. Les expériences faites ont eu principalement pour objectif des questions concernant la science médicale pratique, et elles ont porté en particulier sur la désinfection des mains du médecin et de celles de la sage-femme, en même temps que sur la désinfection pendant l'accouchement dans diverses circonstances. La plupart des auteurs ont utilisé des mélanges concentrés d'alcool éthylique; Wirgin fit exception en se servant d'alcool à 8,5 %, qu'il ajoutait à des cultures dans du bouillon afin d'observer l'effet que, dans ces conditions-là, il aurait sur les microorganismes qu'il s'agissait de détruire[1]). Par un melange d'alcool, j'entends ici et dans ce qui suit, de l'alcool ethylique mélangé d'eau; par alcool absolu, de l'alcool éthylique à environ 99 %.

Russ n'a pas seulement fait une série considérable de recherches sur l'action des forts pourcentages d'alcool sur les bactéries, mais il a aussi donné un aperçu complet sur les publications qui s'y rapportent au point de vue médical[2]).

Du côté des botanistes, Kurzwelly a publié dernièrement quelques recherches qu'il a effectuées sur l'influence qu'une série

[1]) Wirgin. Zur Wirkung des Aethylalkohols auf Mikroorganismen. (Zeitschr. f. Hyg., **40**, (1902)).

[2]) Russ, Zur Frage der Bakterizidie durch Alkohol. (Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. 1, **37**. (1904)).

de produits chimiques plus ou moins anhydres ont eue sur différentes plantes supérieures et inférieures étant soit à l'état humide, soit à l'état desséché[1]). Quelques-uns de ses essais eurent pour but de déterminer l'action de l'alcool éthylique sur les microorganismes suivants: Micrococcus prodigiosus, Sarcina rosea, Bacillus subtilis, et une levure de brasserie (levure basse?).

Pour ce qui concerne la littérature ayant trait à ce sujet, je renvoie le lecteur aux mémoires de Kurzwelly et de Russ que je viens de citer. A cet égard, je n'ai rien d'autre à ajouter; ce n'est que dans les cas où, à l'occasion de mes recherches, j'aurai à m'occuper particulièrement d'une publication quelconque, que je citerai celle-ci.

La présente étude a été occasionnée par mes recherches sur l'eczéma suintant et les bactéries qui s'y trouvent. Dans plusieurs cas, comme on le sait, diverses formes de cette maladie deviennent chroniques par le fait que les attaques reviennent à de courts intervalles, ou plutôt, à vrai dire, que les poussées deviennent subintrantes. Il y a quelques années, j'eus l'occasion d'examiner un cas de ce genre sur moi-même. Après avoir consulté un médecin capable et expérimenté, j'essayai les remèdes ordinaires qui, toutefois, pendant un an, ne me donnèrent qu'un soulagement passager, mais point de guérison (les poussées, en effet, revenaient sans cesse, souvent même à de courts intervalles, et le mal commença à s'étendre davantage); je me souvins alors d'un vieux remède domestique ayant pour but de protéger l'épiderme contre la sueur et la pression: j'ai nommé l'alcool. A un moment donné, les plaies s'étant recouvertes d'une mince pellicule épidermique et mon état général étant, en somme, passable, je baignai chaque jour les parties malades dans de l'eau chaude et, une ou deux fois par semaine, je les savonnais en même temps. Immédiatement après chaque fomentation je posais dessus une compresse préalablement imbibée d'alcool absolu, et je la laissais environ un quart d'heure. Après avoir continué ce traitement durant deux mois environ, j'étais arrivé à fortifier la peau au point que, pour la première fois depuis l'apparition de la maladie, elle resta saine et robuste pendant quelque temps. Dans le cours de la première année, j'eus, il est vrai, deux ou

---

[1]) Kurzwelly, Ueber die Widerstandsfähigkeit trockener pflanzlicher Organismen gegen giftige Stoffe. (Jahrb. f. Wissenschaftl. Botanik, **38**. (1903)).

trois rechutes; mais, après avoir cautérisé les plaies avec une forte solution de nitrate d'argent, et les ayant ensuite baignées pendant quelque temps journellement dans l'eau chaude et recouvertes de pommade de zinc ordinaire, elles se refermèrent passablement vite sous une mince pellicule; en même temps que je recommençais le traitement à l'eau chaude, je recommençais aussi le traitement à l'alcool absolu. En traitant la maladie par ce procédé, j'ai réussi à ne plus avoir de nouvelles poussées depuis plus de cinq ans. Il y a beaucoup de cas où il ne sera pas necessaire de recourir au remède énergique de la cautérisation; les dermatologues modernes préfèrent, sans doute avec raison, l'application de remèdes moins violents. Plus tard, j'ai employé, généralement avec succès, le traitement à l'alcool absolu sur un assez grand nombre de personnes, pour la plupart des hommes âgés de 40 à 62 ans, atteints plus ou moins de cette maladie aux pieds, aux jambes, autour de l'anus ou sur les parties génitales. Je dois faire remarquer qu'il ne s'agissait pas de cas particulièrement graves, et jamais non plus de cas où de très grandes parties du corps étaient atteintes. Même dans des cas où, à vrai dire, pendant plusieurs années la peau n'avait jamais été complètement normale, mais seulement mince, rouge et luisante, je réussis plusieurs fois au moyen du traitement à l'alcool à faire reformer et garder une peau saine ayant repris sa souplesse et sa coloration normales. J'avais lu dans les comptes rendus publiés par de savants médecins sur l'action de l'alcool sur les bactéries, que quelques-uns d'entre eux étaient arrivés à ce résultat que l'action destructive de l'alcool absolu était à peu près ou même absolument nulle, mais que, par contre, un mélange de 50 à 55 % devait avoir, à cet égard, une forte action, même sur les bactéries desséchées. C'est pourquoi, à côté de l'alcool absolu, j'ai employé le plus souvent en même temps le plus faible mélange d'alcool indiqué ci-dessus. J'employais ordinairement l'alcool absolu immédiatement après la fomentation chaude, et, quand il me paraissait utile, la peau une fois séchée, de refaire le traitement dans la même journée, je me servais alors du mélange plus faible. Ce changement de méthode donna, une fois en tout cas, le résultat désiré, et ce passablement vite: ce fut dans un cas où, même après plusieurs semaines, le traitement à l'alcool absolu n'avait pas encore fait repousser la peau d'une manière satisfai-

sante. Il n'est pas nécessaire, je pense, de remarquer expressément que dans une maladie aussi capricieuse que celle dont nous nous occupons ici, il faut adapter le traitement à faire a chaque malade suivant le cas particulier. Parmi les cas que j'appellerai irréguliers, se trouvent aussi ceux où la pommade de zinc paraît être nuisible; dans ces cas-là, au lieu de pommade de zinc, je me servis alors, avec de bons résultats, d'huile d'olive, de vaseline simple ou mélangée d'acide tannique. On demandera peut-être si ce ne serait pas admissible que cet heureux résultat fût exclusivement dû à l'eau chaude, à la pommade de zinc, à l'huile d'olive, *etc.* A cette objection je répondrai que, pendant longtemps déjà, j'avais employé en vain l'eau chaude et la pommade avant de commencer sur moi-même le traitement à l'alcool, et plus tard j'ai fait cette même observation sur d'autres malades aussi. Pour finir, j'insiste en répétant que le traitement à l'alcool ne doit être employé que dans la seconde phase de la maladie (c. à. d. lorsque les parties atteintes ont commencé à se recouvrir d'une peau mince), et l'importance de ce traitement consiste uniquement dans le fait qu'il amène une formation de peau normale. Au début du traitement, il faut nécessairement employer d'autres remèdes: de baigner les parties malades dans de l'alcool, ou bien, de se servir d'alcool pendant un certain temps sous forme de compresse ou autre, ne sert à rien à cette période-là. En tout cas, un malade chez qui la région autour de l'anus était atteinte et qui souffrait beaucoup d'insomnie provoquée par les démangeaisons irritantes et les picotements résultant de sa maladie, pouvait reposer après une fomentation d'alcool absolu. Ce fait se répéta plusieurs fois au cours de la maladie; toutefois, le traitement à l'alcool à cette phase de la maladie n'amena pas, chez lui non plus, la guérison.

Ainsi donc, le procédé que je viens de décrire, avec la restriction indiquée, est d'une utilité fort appréciable; mais comme, d'un autre côté, il semble être peu connu, il m'a paru bon, à cette occasion, d'attirer l'attention là-dessus. Dans leurs excellents traités des maladies de la peau, traités dont on fait usage à l'Université de Copenhague, Pontoppidan et Rasch n'en parlent pas, et je n'ai également rien trouvé sur ce sujet dans les travaux de savants allemands dont j'ai pu prendre connaissance.

On sait, par une vieille expérience, que l'alcool, et surtout

l'alcool concentré, peut tout aussi bien durcir la peau qu'en absorber l'eau qu'elle renferme. A ma connaissance, les sommités médicales qui se sont occupées à faire des expériences et des observations sur l'action de l'alcool sur les tissus, sont maintenant aussi d'accord sur le fait qu'il provoque une hypérémie artérielle et favorise par là une nouvelle formation des tissus. Toutes mes observations ci-dessus mentionnées tendent à confirmer cette manière de voir. Une question ultérieure qui se pose maintenant, est celle de l'action que l'alcool exerce sur les microbes qui se trouvent sur la peau et dans l'eczéma suintant. Je me suis longtemps occupé d'études sur ce sujet et, par là, j'ai aussi été amené à effectuer des recherches d'ordre plus général. Dans ce qui va suivre, je donnerai un aperçu des résultats obtenus par mes essais faits, en premier lieu, avec des bactéries et, en second lieu, avec des champignons de levure.

II.

La plupart de mes essais avec des bactéries, portèrent sur les espèces qui se trouvent ordinairement sur la peau et, d'autre part, sur celles d'un eczéma suintant, lesquelles provenaient tant des phases du début de la maladie que de celles du développement ultérieur; dans les deux cas, les bactéries avaient été prises sur des adultes, et les espèces demeurèrent mélangées telles que je les avais trouvées auxdits endroits. Dans ce qui suit, le premier groupe est désigné sous le nom de bactéries de la peau, le second, sous celui de bactéries de l'eczéma. Dans tous les cas, les bactéries furent prélevées à l'aide de touffes de coton stérilisées. Celles de la peau furent prises autour de l'anus, aux parties génitales et entre les doigts de pieds de personnes qui souffraient depuis assez longtemps de cette maladie. Je pris les bactéries de l'eczéma dans des vésicules fraîchement formées et dans les plaies. Je suis redevable d'une grande partie des matériaux mentionnés en dernier lieu à M. le Dr Rasch, chef de service à l'hôpital communal, ainsi qu'au Dr Haslund, en son vivant professeur à la Faculté de Médecine de Copenhague.

Dans ce qui suit, il ne sera question que de la recherche expérimentale de l'action exercée par l'alcool sur les végétations susnommées. Mes recherches sur les espèces particulières de bactéries et leur manière de se comporter à l'égard des troubles

qui accompagnent la maladie dont nous nous occupons, ne sont pas encore assez avancées pour que je puisse les livrer à la publicité.

Les bactéries avec lesquelles je fis mes expériences se trouvaient en partie à l'état humide, en partie aussi à l'état desséché. Dans le premier cas, elles furent utilisées soit dans l'état où elles se trouvaient immédiatement après avoir été recueillies, soit bien remuées d'abord dans de l'eau, ou, finalement, employées à l'état de jeune végétation ayant été engendrée dans du bouillon mélangé de peptone. Dans tous ces cas, le résultat fut essentiellement le même. Pour obtenir les préparations desséchées, je me servis de bouts de fil de platine d'une épaisseur de $0^{mm},7$ et les trempai à une profondeur de 6 mm. dans la végétation expérimentée, qui avait été fortement étendue. Aussi, le bout de fil n'enleva-t-il qu'une mince couche de cellules. Il fut ensuite déposé dans un flacon Freudenreich stérilisé et complètement vide, après quoi on secoua bien le flacon à plusieurs reprises et dans tous les sens afin de bien répartir les cellules sur les parois et le fond du flacon; il n'en resta que peu sur le bout de platine. Ces flacons furent ensuite placés dans une armoire sombre à la température ordinaire du laboratoire. En somme, j'employai le même procédé que celui dont je m'étais servi antérieurement pour mes recherches sur la limite de la vie chez les cellules de levure desséchées (Comptes-rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg, **4**, (1898)). Au bout de 24 à 48 heures, les cellules étaient desséchées. Chacun des flacons dans lesquels le bout de platine recouvert de cellules avait été déposé, donna matière à deux expériences; à cet effet, le bout de fil fut transféré dans un flacon contenant un mélange d'alcool, puis on mit de l'alcool à la même concentration sur les cellules restées dans le flacon d'où le bout de fil avait été pris. Après que le mélange d'alcool eut exercé son action dans le délai voulu, les cellules furent transportées dans du bouillon mélangé de peptone. Quand, après avoir été ainsi cultivées à des températures favorables et conservées pendant quinze jours, les cellules ne donnaient pas encore de signe de vie, elles étaient considérées comme étant tuées.

Après avoir été traitées à l'alcool, les végétations qui se trouvaient à l'état humide furent cultivées de la même manière que les végétations desséchées. Après avoir été une minute seulement sous l'action de l'alcool absolu, elles étai-

ent toujours tuées, le plus souvent aussi, par des mélanges de 60 à 50 % d'alcool; par contre, les mélanges à 45 % et au-dessous n'avaient pas une action aussi rapide.

Les végétations à l'état desséché se comportèrent autrement à l'égard de l'alcool absolu: en effet, dans tous les cas examinés, après avoir été exposées une minute à son action, elles étaient encore vivantes. Par contre, dans le même délai, sous l'action d'alcool de 60 à 50 %, elles étaient toujours tuées; tout comme les cellules humides, les cellules desséchées pouvaient aussi supporter pendant une minute et plus, l'action ci-dessus mentionnée des mélanges d'alcool au-dessous de 50 %. Ainsi donc, les cellules desséchées soumises à l'action de l'alcool absolu pendant une minute n'étaient pas tuées; deux essais que je fis montrèrent qu'elles pouvaient même supporter cette action pendant 8 minutes. Je ne suis pas arrivé à trouver la limite de l'action, quant au temps. Le mélange de 60 à 50 % avait une action destructive singulièrement rapide sur les bactéries desséchées.

Les bactéries de la peau et celles de l'eczéma se comporterent de la même manière, aussi bien dans les essais faits avec les cellules humides que dans ceux avec les cellules desséchées.

Le fait que les bactéries à l'état humide possèdent une force de résistance à l'action de l'alcool concentré moins prononcée que les bactéries desséchées trouve, selon Gruber, son explication naturelle dans ce que les parois des cellules desséchées doivent d'abord absorber de l'eau et se gonfler quelque peu avant que l'alcool puisse pénétrer à l'intérieur de la cellule. Par conséquent, plus la cellule est desséchée, plus l'action exercée par un mélange d'alcool plus ou moins hydraté sera forte en comparaison de celle qu'exerce un mélange concentré. Une autre question est le fait que le mélange d'alcool doit avoir une certaine concentration pour qu'il puisse, dans un délai donné, exercer une action destructive.

Quant à la manière de comprendre le traitement à l'alcool de l'eczéma suintant, traitement que je viens de décrire, les expériences nous font voir que l'alcool a le pouvoir de tuer les bactéries de la peau comme celles de l'eczéma. S'agit-il de désinfecter des parties de peau sèches, il faut employer un mélange de 50 à 60 % d'alcool; sur la peau rendue humide par la fomentation, l'alcool absolu, en outre des autres effets dont il

a été parlé précédemment, exercera en même temps une forte action bactéricide.

N'ayant pas trouvé une seule espèce formant des spores, ni parmi les bactéries de la peau, ni parmi celles de l'eczéma, mes expériences ne portent donc que sur des cellules végétatives.

Des recherches de Pasteur et de celles de Koch surtout, il ressort que les spores du bacille du charbon peuvent survivre à un très long traitement à l'alcool à toutes les concentrations; selon Koch, ces spores sont encore en vie même après avoir été 110 jours sous l'action de l'alcool, et elles ne peuvent peut-être même pas du tout être tuées par l'alcool. D'autres savants sont arrivés plus tard au même résultat principal, et ce, aussi pour ce qui concerne les spores du Bacillus subtilis. Une liste bibliographique concernant ces questions-ci aussi bien que les autres questions bactériologiques traitées dans ce chapitre, se trouve dans le mémoire de Russ.

III.

On voit par le mémoire de Russ que ceux qui, parmi les médecins, se sont occupés de cette question avant moi, ont fait leurs expériences avec d'autres végétations de bactéries que celles dont je me suis servi. Quelques-uns de ces savants ont obtenu, pour ce qui concerne les bactéries de la peau et de l'eczéma, les mêmes résultats principaux que ceux que j'ai fait ressortir dans ce qui précède, ce qui me fait croire que maintenant on peut mettre en fait l'exactitude de ces résultats. Le désaccord survenu sur différents points et qui s'est souvent manifesté dans diverses publications, s'explique par le fait que les expériences n'ont pas toujours été effectuées avec toute la minutie requise. Des difficultés d'ordre pratique embarrassent ici, et de petites sources d'erreurs peuvent avoir pour effet que le résultat d'une expérience peut être tout autre que celui d'une autre expérience. C'est surtout en faisant les préparations desséchées qu'on rencontre de grandes difficultés. Se sert-on de fils de soie, par ex., à l'imitation de la plupart des auteurs, les cellules se ramasseront sur elles-mêmes et, pour ce motif, le résultat de l'expérience sera peu sûr.

Aussi me suis-je servi d'un autre procédé pour mes expériences, ci-dessus décrites, avec les bactéries de la peau et de

l'eczéma[1]. Les expériences dont la description va suivre ont eu avant tout pour but d'éclaircir ce procédé dans tous ses détails, afin de pouvoir contribuer par là à une méthodologie exacte dans ce domaine. Les expériences furent faites avec deux formes de bactéries du groupe Coli et une bactérie d'acide acétique, Bact. Pasteurianum[2]).

Pour mes expériences avec les bactéries de la peau et de l'eczéma, je procédai au dessèchement des cellules à la température ordinaire du laboratoire, afin de me rapprocher autant que possible des conditions de leur milieu habituel. Par contre, pour les expériences que je vais décrire, j'effectuai le dessèchement à une température élevée, ainsi que Russ l'avait fait. En procédant de cette manière, les expériences se faisaient plus rapidement; d'un autre côté, j'arrivais ainsi au but que je m'étais également proposé: celui d'établir une comparaison avec les recherches qu'il avait décrites.

L'opération du dessèchement a pour but d'éliminer l'eau des cellules jusqu'au point où, en prolongeant l'opération, la mort surviendrait. Si l'on interrompt le procès à un point encore trop éloigné de cette limite, les cellules ne seront pas desséchées en réalité, et leur teneur en eau pourra même encore être si considérable que, précisément pour ce motif, l'alcool pénétrera jusque dans le plasma et tuera les cellules. C'est pourquoi, dans une préparation desséchée comme elle doit l'être, il y aura toujours quelques cellules qui seront tuées, tandis que la grande majorité des cellules seront encore en vie. Mes expériences ont toutes été faites suivant ce principe.

[1]) Minervini a été seul à employer à peu près à la même époque que moi des fils d'archal pour ces essais; mais on n'accorda aucune attention à cette amélioration de la technique.

[2]) Les deux bactéries Coli provenaient d'intestins humains, et les cultures pures qui en avaient été préparées étaient dues à l'obligeance du Prof. et Dr C. O. Jensen, que je prie de vouloir bien accepter ici encore mes sincères remerciements.

Bact. Pasteurianum est une espèce établie par moi déjà en 1878 (Comptes-rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg, **1**) et que j'ai employée plus tard pour faire diverses recherches d'ordre biologique et technique. (Ces mêmes Comptes-rendus 1894 et 1900). On peut se procurer cette espèce comme, en général, celles que j'ai introduites dans la littérature, au Laboratoire bactériologique du Dr Král à Prague.

Essais avec le Bact. coli.

20 fils de soie, longs de 3 cm., furent mis durant une heure dans une jeune et vigoureuse végétation dans du bouillon mélangé de peptone, puis transvasés dans des boîtes de Petri, dans lesquelles ils furent exposés dans l'étuve à une température d'environ 37° C. durant 3 heures pour y subir une dessiccation. Les végétations ainsi desséchées passèrent ensuite, pendant une minute, dans des ballons renfermant de l'alcool et soigneusement bouchés, puis elles furent rincées dans de l'eau stérilisée, et chacun des fils fut déposé dans un flacon renfermant du bouillon mélangé de peptone afin d'y cultiver, à une température de 37° C., la végétation adhérente au fil. Ce procédé était de point en point celui indiqué par Russ.

A titre de comparaison avec cet essai, je fis un essai analogue en me servant des bouts de fil de platine dont j'ai déjà parlé, et ayant soin que les cellules fussent bien réparties. La dessiccation comme aussi la culture faite en vue de vérifier si les cellules étaient encore en vie, furent effectuées de la même manière que pour les végétations adhérentes aux fils de soie. Par le fait de la grande dispersion des cellules qui a lieu dans ce cas, il arrivera toujours qu'un nombre plus ou moins grand de cellules périront pendant le dessèchement. Aussi est-on obligé de faire un essai particulier dans le but de savoir combien de végétations sont encore en vie au moment où elles sont soumises à l'action de l'alcool. C'est pourquoi l'essai fut divisé en deux séries comprenant chacune 40 végétations desséchées. La culture du groupe A commença de suite; le groupe B passa d'abord à l'alcool pendant 1 minute, ensuite à l'eau stérilisée et, finalement, à la culture qui devait fournir la preuve si la vie était encore dans les cellules de ce groupe.

Les 20 végétations adhérentes aux fils de soie montrèrent après moins de vingt-quatre heures déjà, un développement manifeste de la bactérie ensemencée.

Des 40 végétations du groupe A, 38 donnèrent des signes de développement après moins de quinze jours. 2 avaient donc péri au cours du dessèchement.

Après quinze jours, il n'y avait pas une seule des 40 végétations du groupe B qui montrât le moindre signe pouvant indiquer un développement. L'alcool avait donc tué toutes les cellules qui avaient survécu au dessèchement, — c'. à. d. le nombre de

beaucoup le plus grand, ainsi qu'il ressort de l'essai fait avec le groupe A. Ce résultat était donc l'opposé de celui que l'essai avec les fils de soie avait donné.

Pour ces essais, comme d'ailleurs aussi pour les autres, il est à remarquer que le point de départ en avait été une végétation jeune et vigoureuse et que, malgré le peu d'épaisseur avec laquelle les végétations étaient réparties sur les bouts de fil de platine, je pus néanmoins opérer avec un très grand nombre de cellules dans chaque flacon.

Je fis, exactement de la même manière, un essai ultérieur avec une forme qui se rapprochait beaucoup de l'espèce susnommée. Elle était caractérisée par le fait que, au cours de sa croissance, elle rendait fortement visqueux le liquide nutritif, bouillon mélangé de peptone. Je pus constater que les cellules réparties en grand nombre tant sur les fils de platine que sur les parois intérieures et au fond des flacons, se comportaient à l'état desséché comme celles qui s'étaient desséchées sur les fils de soie: dans tous les cas examinés, après avoir subi le traitement à l'alcool durant 1 minute, les cellules étaient toutes vivantes. Il est admissible que la couche visqueuse qui se forme chez cette espèce a protégé les cellules aussi bien contre le dessèchement que contre l'action destructive de l'alcool.

Essais avec Bact. Pasteurianum.

Afin de mieux éclaircir encore les questions d'ordre méthodologique posées, je pris en outre, pour ces essais, la bactérie d'acide acétique nommée ci-dessus. La bière double, bière à fermentation haute, riche en extrait et qui, après la stérilisation, contient environ 1 % d'alcool en vol., forme pour cette espèce le milieu nutritif le plus propice. A la surface de cette bière, il se fit une formation de zooglées, qui donna un voile vigoureux de nature liée et souvent plus ou moins cartilagineuse. Une température de 33° C. est favorable. La culture s'opéra dans le milieu nutritif précédemment mentionné et à cette température de 33° C. La dessiccation fut consommée dans un délai de $2^1/_2$ heures à la même température. Du reste, l'essai fut effectué de la manière décrite plus haut. Dans les essais que je vais décrire maintenant, les végétations ayant été seulement desséchées seront désignées — comme précédemment —

par A, et celles qui en outre de la dessiccation auront subi le traitement à l'alcool pendant une minute, le seront par B.

Les végétations adhérentes aux 20 fils de soie donnèrent toutes signe de vie.

Les 40 végétations appartenant au groupe A étaient également toutes vivantes.

Sur les 40 végétations qui formaient le groupe B, 25 étaient tuées. Ainsi donc, dans ce cas-ci, le traitement à l'alcool a exercé une action destructive manifeste sur une grande partie des végétations desséchées. Le fait que néanmoins 15 cellules avaient conservé la vie, est dû à ce que la couche de cellules, malgré la dispersion, était si épaisse que quelques-unes des cellules qui se trouvaient à l'intérieur de ladite couche ont pu échapper à l'action de l'alcool.

Afin d'obtenir aussi de cette espèce une végétation dont les cellules pourraient se laisser disperser en une couche assez mince pour que chacune des cellules pût facilement être exposée à l'action de l'alcool, je fis encore un essai, pour lequel la semence provenait d'une culture faite dans une solution se composant d'eau de levure additionnée de 10 % de dextrose et 1 1/2 % d'alcool. De fait, les cellules cultivées dans cette solution se laissèrent beaucoup plus facilement séparer les unes des autres et disperser en couches très minces. Comme les végétations adhérentes aux fils de soie n'étaient pas encore entièrement desséchées après un délai de 2 1/2 heures à une température de 33° C., la dessiccation fut prolongée pendant encore un peu plus de 3 heures. A part cela, le procédé fut le même que pour l'essai précédent.

Dans cet essai-ci, les végétations adhérentes aux fils de soie donnèrent également toutes signe de vie.

De même aussi, les 40 végétations du groupe A accusèrent toutes un développement.

Mais, par contre, sur les 40 végétations du groupe B, il n'y en eut que 5 qui le donnèrent. Les 35 végétations desséchées avaient donc été tuées après avoir été soumises durant 1 minute à l'action de l'alcool, ce qui prouve que la dispersion avait été mieux faite qu'au premier essai.

Pour finir, je fis encore avec la même espèce de bactérie un troisième essai de la même manière que j'avais fait l'essai

précédent, avec la seule différence que j'employai de l'alcool à 82 % au lieu d'alcool absolu.

Résultat: toutes les végétations adhérentes aux 20 fils de soie, de même que les 40 végétations du groupe A, se maintinrent en vie, tandis que les 40 végétations du groupe B furent toutes tuées. Ainsi donc, l'alcool à 82 % avait aussi tué les cellules desséchées qui se trouvaient en couches minces.

Dans les essais faits avec le Bact. Pasteurianum, le développement commença à se manifester dans les flacons contenant les végétations du groupe A dans le cours de 3 à 13 jours, tandis que dans les flacons appartenant au groupe B, le développement ne fit son apparition que dans le délai de 6 à 45 jours. Par conséquent, le traitement à l'alcool a eu chez cette espèce de même que chez l'une des formes du Bact. coli, non seulement pour effet de tuer un grand nombre de cellules desséchées, mais aussi de ralentir fortement le développement dans tous les cas où tant est qu'il s'en forme un. En effet, la lenteur du développement peut à peine être exclusivement motivée par le fait que l'alcool aurait tué la plus grande partie des cellules; au contraire, le phénomène constaté devrait sans aucun doute être rapporté aussi à ce que, dans quelques cellules, l'alcool n'aurait pénétré que très faiblement dans le plasma et que, par conséquent, il n'aurait pas pu déterminer la mort, mais, toutefois, un affaiblissement si considérable que la multiplication a seulement pu commencer à se faire après une culture prolongée.

Résultats généraux des recherches relatives à la Méthodologie.

Ainsi, ces essais faits avec deux formes du Bact. coli et avec la bactérie d'acide acétique susnommée, montrent, conformément aux communications de Russ et à celles des autres médecins qui m'ont précédé dans l'étude de cette question, que les cellules végétatives desséchées adhérentes aux fils de soie supportent sans difficulté le traitement à l'alcool que nous avons décrit. Si l'on se borne à la question de savoir comment se comportent des couches de cellules aussi épaisses, on ne peut également rien objecter à cette manière d'opérer. Par contre, cette question se présente tout autrement si on la soulève en demandant comment se comporte chaque cellule en

particulier: alors ce procédé devient inutilisable. Dans ce dernier cas, ainsi que nous l'avons vu, il faut agir d'après une méthode par laquelle les cellules se laissent répartir en couches si minces que chaque cellule vienne à subir l'action du toxique.

Une question importante au point de vue méthodologique est, en outre, celle de savoir combien de temps il est nécessaire de prolonger la culture entreprise pour arriver à reconnaître si les cellules expérimentées sont vivantes ou non. Russ termine cette culture après 48 heures. Je ne nierai pas que cela ne puisse être juste pour quelques espèces, mais en général on ne peut en rester là. Même aussi chez des espèces pour lesquelles le bouillon mélangé de peptone constitue un liquide nutritif des plus favorables — motif pour lequel aussi elles y furent cultivées —, je trouvai que parfois un développement n'était visible que lorsque la culture avait duré 10 jours à une température favorable. C'est pourquoi ces essais ne furent terminés qu'après un délai de quinze jours. Les essais faits avec le Bact. Pasteurianum nous donnent un exemple d'un développement lent à se faire qui mérite notre attention, puisque la limite dans laquelle le développement se fait va même jusqu'à près de 50 jours. On suppose toujours pour ce cas les conditions de culture les plus favorables à cette espèce, et par développement on comprend une multiplication visible à l'œil nu.

Autant des essais faits par ses prédécesseurs avec diverses bactéries, que de ses propres essais avec Bact. coli, Staphylococcus pyogenes aureus, Bacillus anthracis et Bacillus diphteriæ, Russ tire la conclusion que «sur les bactéries desséchées, l'alcool, sans ou presque sans addition d'eau, n'a pas plus d'effet mettant obstacle au développement que d'action destructive». Autant que mes essais l'ont fait voir, cette loi sera aussi bien quelque peu admissible pour l'une des formes du Bact. coli examinées, et on peut dire également qu'elle le sera aussi pour l'autre forme du Bact. coli et pour le Bact. Pasteurianum, lorsque les végétations ont été desséchées sur les fils de soie, c'est-à-dire en couches épaisses, mais, bien entendu, seulement avec cette restriction. Mais quand, au contraire, la méthode rigoureuse était employée vis-à-vis des deux espèces nommées en dernier lieu, on pouvait constater très distinctement que l'alcool

exerce aussi une action destructive sur les cellules desséchées des bactéries. Il s'en suit donc que la loi susmentionnée n'a aucune valeur.

IV.

Dans ce chapitre, nous allons traiter de l'action de l'alcool éthylique sur les cellules de Saccharomyces. Sur ce sujet, il existe des recherches publiées par Claude Bernard et Kurzwelly[1].

Claude Bernard a été amené à faire les recherches en question par ses considérations sur la vie latente, qu'il définit comme étant l'état chimiquement indifférent de l'organisme, et il nomme le dessèchement comme étant le facteur le plus important propre à provoquer cet état. Contrairement à Tiedemann et a d'autres physiologistes, il prétend qu'on ne peut pas considérer la vie latente comme une vie seulement atténuée de telle façon que ses manifestations échappent à l'observation. Son avis est que, par suite du dessèchement, le plasma pourra cesser toute fonction chimique et que, sous ce rapport, il pourra être complètement soustrait aux influences extérieures sans perdre la vie pour autant.

Pour que cet état absolument indifférent sous le rapport chimique pût se concevoir, il faudrait que le plasma eût perdu sa dernière trace d'eau; mais, même si, avec la plus grande prudence, nous continuons assez longtemps la dessiccation, il arrivera quand même toujours un moment où la mort surviendra. D'après Claude Bernard, on devrait, au contraire, supposer que, dans ces conditions, la cellule serait mise dans un état où la vie se continuerait indéfiniment; mais, comme nous l'avons vu plus haut, cela n'a pas lieu.

Pour ses essais, il se servit principalement de levure de bière. Quand on prend un peu de levure ayant toute sa force, dit-il, et qu'on la soumet à une dessiccation graduelle, les cellules de levure passent alors à un état de vie latente qui permet de les exposer à une température très élevée et à l'action continue de l'alcool sans qu'elles en meurent. En effet, on n'a qu'à les remettre dans des conditions favorisant le retour à la vie

[1]) Claude Bernard: Leçons sur les phénomènes de la vie. T. I. Paris 1878. Le mémoire de Kurzwelly a été précédemment cité.

pour qu'elles revivent et se développent à nouveau. Comme résultat de cette expérience, Claude Bernard nous dit que, tandis que la levure de bière fraîche à l'état humide ne se garde en vie dans l'alcool absolu que trois à quatre jours, la même levure à l'état desséché conservait la vie dans ces conditions durant un an et demi.

Kurzwelly se servit également de levure de brasserie pour ses expériences; autant que je puis en juger, c'était une levure basse. Il en prépara une culture pure, qu'il continua alors à cultiver dans un milieu nutritif à base d'agar contenant 7 % de glucose renfermé dans des boîtes de Petri, et après qu'il s'y fut formé une masse de levure suffisamment grande, on étendit celle-ci sur des bandes de papier à filtrer. Ces bandes de papier ainsi recouvertes de levure furent immédiatement mises dans de l'alcool absolu, et Kurzwelly nous dit que, après trois jours, la levure était encore en vie.

Dans la seconde partie de son expérience, il plaça de ces bandes de papier à filtrer également recouvertes de levure dans un exsiccateur, où il les laissa deux semaines et plus; d'après sa table, seize jours. Là-dessus, le papier avec la levure desséchée fut mis dans l'alcool absolu et, après avoir séjourné 363 jours dans ce liquide, les cellules se trouvèrent être encore vivantes. Pour abréger, je ne désignerai dans la suite l'alcool absolu que par le mot alcool tout court, comme précédemment.

Selon Claude Bernard, la levure de brasserie humide se maintient vivante dans l'alcool durant trois à quatre jours. Ce résultat est tout à fait contraire à ceux des expériences que, déjà avant d'avoir lu son livre, j'avais faites avec la levure, tant en couches minces qu'en couches passablement épaisses: les cellules moururent en moins d'une minute. D'après la description qu'il donne de ses essais, on serait plutôt porté à croire qu'il a opéré avec des couches de levure fort épaisses. Dans ces conditions, on pourrait sans doute supposer que l'alcool aurait provoqué la formation d'une couche protégeant les cellules qui se trouvaient à l'intérieur et que, par suite, elles auraient échappé à l'action du toxique. Afin de me rendre compte si mon célèbre prédécesseur ne devait cependant pas avoir raison à ce point de vue-là, j'effectuai quelques essais avec des couches de levure très épaisses, de vraies petites boules, se composant de levure basse N° 1 de Carlsberg, de levure haute de brasserie et de le-

vure haute de boulangerie; mais, dans tous ces cas, les cellules furent tuées bien avant trois jours. Je dois conclure de ce résultat que Claude Bernard n'a fait qu'un seul essai et qu'il n'a pas été heureux en le faisant. Son insuccès paraît être dû à ce que les cellules qui devaient être transvasées dans l'alcool se seront attachées au col du flacon, et étant ainsi au-dessus du liquide, elles auront échappé à son action toxique.

Quant à la seconde indication de Claude Bernard, je puis en confirmer en partie l'exactitude; les cellules desséchées peuvent supporter l'action de l'alcool beaucoup plus longtemps que les cellules humides. Toutefois, Claude Bernard n'a pas remarqué que, même aussi par ce dispositif, l'alcool attaque peu à peu les cellules et finit par éteindre en elles toute trace de vie.

On se souvient que Kurzwelly trouva que des cellules de levure humide supportèrent plus de trois jours l'action de l'alcool. Ce résultat semble devoir confirmer celui auquel Claude Bernard était arrivé. Un examen plus approfondi montre cependant qu'il n'en est pas ainsi.

Lors des expériences que je fis dans le but d'établir des méthodes propres à conserver la levure pure à l'état desséchée, il me vint à l'idée que les cellules d'une masse de levure desséchée renfermée dans de la gélatine fondue, puis séchée, devaient par là être mises en état de résister à des attaques nuisibles provenant de l'extérieur, y compris celles de l'alcool, et qu'ainsi leur vie serait prolongée. Aussi, les essais relatifs à cette question que j'ai faits jusqu'à présent et qui seront décrits dans un mémoire assez consequent sur la limite de la vie chez les espèces de levure — mémoire qui paraîtra dans les Comptes-rendus de notre laboratoire — ces essais, dis-je, vont-ils tous dans ce sens. Je concentrai donc mon attention surtout sur le milieu nutritif gélatineux. Comme Kurzwelly dans ses essais dont il a été parlé plus haut, n'avait pas procédé à la dessiccation, je n'y procédai pas davantage pour les essais que j'effectuai en vue de vérifier l'exactitude de ceux de Kurzwelly.

Je me servis de la levure basse N° 1 de Carlsberg comme aussi de la levure de vin dite Johannisberg II, introduite dans la littérature par Aderhold et Wortmann. La culture ne s'effectua pas seulement, suivant les indications de Kurzwelly, dans du bouillon mélangé de peptone et d'agar, dans lequel, pour un des essais, on avait ajouté de la dextrose et, pour l'autre, de

la saccharose, mais aussi sur du moût gélatiné. Du reste, je m'en tins aux indications de Kurzwelly. Je pus alors constater que sur les 30 bandes de papier enduites de levure, 5 supportèrent l'action de l'alcool pendant trois jours, tandis que la même levure provenant d'une culture faite dans du moût de bière, — donc sans la moindre coulée gélatineuse —, disposée tant en couches minces qu'en couches épaisses, fut toujours tuée bien avant la fin de ce même delai. Ainsi donc, en suivant le dispositif de Kurzwelly, on peut parfois obtenir une masse de levure qui paraît pouvoir supporter le traitement à l'alcool; mais cela doit être rapporté au fait que, par la coulée dans l'agar-agar et la gélatine, les cellules ont échappé à l'action du toxique. En continuant le traitement pendant quelques jours encore, l'alcool finira par pénétrer dans les cellules et les tuera.

Ce que j'ai dit à propos des essais de Claude Bernard, sur la manière dont se comportent les cellules desséchées vis-à-vis de l'alcool, s'applique aussi aux essais que Kurzwelly a faits sur ce même sujet.

A l'aide du microscope, on avait longtemps cherché en vain des formations gélatineuses chez les cellules de levure; mais, en 1885 (Botan. Centralbl., **21**), je démontrai que les cellules de levure pourvoient à une formation glaireuse qui, par une préparation déterminée, apparaît comme un réseau gélatineux et qui les protège contre les attaques de genres divers, au cas particulier contre l'action de la dessiccation et celle de l'alcool[1]). Je trouvai également que, par un lavage, on peut éloigner, en grande partie du moins, cette formation glaireuse, et que, après avoir été ainsi traitées, les cellules résistaient moins bien aux influences nuisibles dont nous avons parlé.

On a fait remarquer plus haut combien grande est la différence que montrent les bactéries, quant à leur pouvoir de résister à l'action de l'alcool, selon qu'il s'agit de cellules végétatives ou de spores.

Ces constatations m'amenèrent à approfondir la question de

---

[1]) En parlant de cette formation glaireuse, Kurzwelly a donné une version inexacte de la manière de voir de de Bary sur cette question. Il n'a connu ni les travaux de Will à ce sujet, ni les miens. Klöcker ayant parlé de ce fait dans le Centralbl. f. Bakt., 2. Abt. **14**, 753, (1905), je me bornerai donc à le mentionner ici.

savoir si, au moyen du traitement a l'alcool, on ne pourrait peut-être pas aussi arriver à tuer les cellules végétatives dans les végétations de Saccharomyces de manière à ce que les spores seules restent en vie. Cette question est d'une grande importance pour différentes recherches; elle s'est surtout posée à deux reprises dans mes études sur la variation et l'hérédité. C'est ainsi que dans les recherches sur l'asporogéneité, il est d'une grande importance de savoir si toutes les cellules d'une végétation sont asporogenes ou non; si, parmi les milliers de cellules avec lesquelles on opère, il ne s'en trouve pas par hasard une qui soit restée sporogène; — de même aussi, dans les recherches sur les phénomenes de fermentation haute et de fermentation basse, où il s'agissait de produire une fructification de spores abondante mais parfaitement pure et exempte de tout mélange de cellules végetatives. Chez les bactéries, on y arrive facilement, non seulement au moyen du traitement à l'alcool dont nous avons parlé ci-dessus, mais aussi par le chauffage; chez ces organismes, il y a une grande différence entre ce que peuvent supporter à cet égard, les spores, d'un côté, et, de l'autre, les cellules végétatives. Pour ce qui concerne le chauffage employé pour les cellules de Saccharomyces, mes recherches de l'année 1883 (Comptes-rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg, **2**) montrèrent déjà que les spores d'une seule et même espèce, arrivées a un parfait état de maturité, résistent bien à un plus fort chauffage que les jeunes cellules végétatives, — mais je constatais aussi en même temps que les cellules végétatives arrivées à un âge plus avancé peuvent supporter beaucoup plus que les jeunes cellules, ce qui fait que la différence existant entre les cellules végétatives et les spores s'atténue peu à peu, de telle sorte que tout tombe dans le vague. Il n'a également pas été possible d'obtenir un resultat sûr par un autre moyen.

Dans mes recherches sur l'asporogénéité, j'ai particulièrement opéré avec la levure de vin dite Johannisberg II dont il est parlé plus haut, et c'est aussi pourquoi je choisis cette espèce pour les essais ayant pour but de trouver, à l'aide du traitement à l'alcool, une méthode capable de satisfaire aux exigences que nous venons de préciser. Les végétations que j'utilisai furent cultivées dans du moût de bière. Par des jeunes cellules, j'entends une génération provenant d'une culture ayant duré de 1 à 2 jours à une température de 25° C.; par de vieilles cel-

lules, j'entends une culture de 15 à 30 jours à la température ordinaire. Les spores ne furent pas enlevées à des cultures faites sur des blocs de plâtre, mais à des cultures faites dans une mince couche d'eau distillée renfermée dans des flacons Freudenreich légèrement bouchés avec des tampons de coton. Cette culture fut effectuée à une température de 25° C. et dura ordinairement de 6 à 9 jours. Après un délai de cette durée, les cellules sont arrivées à parfaite maturité.

Les cas peu nombreux où l'on fit des essais avec de jeunes spores sont mentionnés expressément, et, dans ces cas-là, les spores provenaient de cultures faites dans de l'eau et qui n'avaient séjourné que de deux à quatre jours à cette température de 25° C. On ne fit pas usage de la culture ordinaire sur blocs de plâtre[1]) pour le motif que, dans ces cultures, il peut se former une masse de zooglées, ce qui rendrait la séparation des cellules impossible et ferait alors que quelques-unes d'entre elles pourraient échapper à l'action de l'alcool.

Le résultat de 15 séries d'expériences montre que les cellules végétatives, les vieilles comme les jeunes, furent tuées après avoir séjourné une minute dans l'alcool absolu, et qu'elles le furent également dans l'alcool à 50% dans le même délai; les jeunes spores se comportèrent de la même manière que les cellules végétatives, tandis que, au contraire, les spores arrivées à la maturité parfaite se maintinrent en vie dans les mêmes conditions beaucoup plus longtemps qu'une minute. C'est donc ainsi que fut trouvée une méthode qui nous permet de tuer les cellules végétatives se trouvant mélangées aux spores, sans que celles-ci s'en ressentent sensiblement. Pour atteindre ce but, je me suis servi ordinairement d'alcool absolu.

Les essais ci-dessus décrits, on s'en souvient, furent faits avec des cellules à l'état humide; à titre de comparaison, j'en entrepris en outre avec des cellules desséchées. L'opération de la dessiccation s'effectua dans des flacons Freudenreich de la manière ci-dessus exposée, au moyen de bouts de fils de platine. Dans ces conditions, les spores comme les cellules végé-

[1]) Dans mes mémoires sur les ferments alcooliques, j'ai décrit à plusieurs endroits mes méthodes propres à la sporiculture. Klöcker en a donné un précis très clair dans son ouvrage: «Die Gäringsorganismen», 2ème édition, Stuttgart 1906.

tatives seront desséchées après avoir séjourné deux heures trois quarts dans l'étuve à 38°, et dans l'exsiccateur elles le seront après un séjour de cinq heures et demie à la température ordinaire. Les cellules se montrent complètement desséchées après chacun de ces modes d'opération, et, en faisant les cultures vérificatrices, je pouvais constater que la plupart avaient conservé la vie. Comme dans quelques rares flacons, la végétation entière était tuée, il en ressortait, à n'en point douter, que la limite voulue pour le dessèchement était atteinte.

Les cellules végétatives ainsi desséchées purent résister pendant plus de deux minutes à l'action de l'alcool absolu, mais elles ne purent même pas une minute supporter celle de l'alcool à 50 %. La règle paraît devoir être que la mort survient après un séjour de cinq minutes dans l'alcool absolu. Les spores desséchées se maintinrent en vie durant plus de six jours dans l'alcool absolu, mais, dans l'alcool à 50 %, elles étaient déjà tuées en moins de trois jours. Il résulte de ces essais que par le dessèchement, le pouvoir de résistance des cellules vis-à-vis du traitement à l'alcool est augmenté dans tous les cas; dans ces conditions aussi, celui des spores est plus grand que celui des cellules végétatives. L'action destructive de l'alcool à 50 % est plus rapide que celle de l'alcool absolu. On peut aussi arriver à obtenir une méthode pareille à celle décrite plus haut, en prenant des cellules desséchées comme point de départ; mais, comme les opérations en auraient seulement été plus compliquées, j'ai suivi la méthode ci-dessus exposée pour faire les recherches sur la variation et l'hérédité dont j'ai parlé dans un mémoire antérieur, en prenant la végétation humide comme point de départ.

Donc, après que la méthode désirée fut trouvée pour ce qui concerne la levure de vin mentionnée, la question se posait de savoir si cette méthode pouvait s'appliquer aux Saccharomycètes en général. Je trouvai bientôt une autre espèce — une levure pressée — avec laquelle la méthode donna aussi des résultats tout à fait satisfaisants, mais ensuite, il y eut une série d'espèces qui, sous l'un ou l'autre rapport, formaient des exceptions. C'est ainsi que parmi 16 espèces, il s'en trouva 4 dont les cellules végétatives survécurent à l'action de l'alcool d'une durée de plus d'une minute, et je trouvai assez souvent des espèces dont les spores ne supportèrent pas cette même action durant une minute.

Ces exceptions ne se constatèrent pas seulement parmi les levures de culture et les levures sauvages conservées très longtemps au laboratoire, mais aussi chez les levures sauvages qui, peu de temps auparavant, avaient été recueillies dans la nature. Ces faits confirment à nouveau la règle bien connue de vieille date, que les espèces réagissent diversement en présence d'agents extérieurs.

Dans la peau altérée et visqueuse qui caractérise l'eczéma suintant, il ne se trouve pas seulement des bactéries, mais parfois aussi des cellules de levure, qui, toutefois, ne s'y rencontrent que tout à fait exceptionnellement. En ce sens, le présent chapitre n'a rien à faire avec la question qui, au début, m'avait amené à entreprendre les recherches dont on vient de lire l'exposé. Toutefois, les levures ne sont point étrangères à la littérature médicale; au contraire, elles y ont joué depuis quelques années un rôle de plus en plus important, et ce non seulement sous le rapport théorique, mais aussi au point de vue purement pratique. C'est ainsi qu'il a été signalé à différentes reprises que dans diverses circonstances les cellules de levure sont aptes à provoquer des maladies. En me plaçant à ce point de vue, j'ai pensé que les essais précédemment décrits concernant l'action de l'alcool éthylique sur les cellules de levure pouvaient convenablement trouver leur place à côté de mes expériences antérieures sur les bactéries.

Dans les nombreuses analyses que j'ai eu à faire, mes aides M. M. Klöcker et Schiönning m'ont prêté un précieux concours, pour lequel je tiens à leur renouveler encore ici mes remerciements.

Résultats généraux des Recherches sur la Levure.

La méthodologie rigoureuse exposée dans le précédent chapitre au sujet des bactéries, s'est montrée également applicable aux Saccharomycètes.

C'est par ce moyen qu'a été élaboré le procédé susmentionné permettant de débarrasser les fructifications de spores de toutes les cellules végétatives qui pourraient s'y trouver mélangées.

Au reste, les recherches relatées dans le présent chapitre ont démontré que les règles principales trouvées dans le cas des bactéries s'appliquent aussi au Saccharomyces. Pour ce qui con-

cerne le pouvoir de résistance vis-à-vis de l'alcool, j'ai pu constater que la différence principale existant entre ces deux classes de microorganismes consiste en ce que chez les Saccharomyces, les cellules végétatives à l'état desséché, les spores non seulement à l'état desséché mais encore à l'état humide, résistent moins bien que les cellules végétatives et les spores des bactéries.

Laboratoire de Carlsberg, à Copenhague, août 1907.

RECHERCHES TITRIMÉTRIQUES.

I. SUR LES SUBSTANCES TYPES EN GÉNÉRAL[1].

PAR

S. P. L. SØRENSEN.

Depuis quelques années, la question relative à la substance type titrimétrique a fait l'objet de vives discussions; elle a été à l'ordre du jour des trois derniers congrès internationaux de chimie appliquée, et au dernier de ces congrès la Commission internationale analytique a été chargée de l'examiner plus à fond. Néanmoins, les spécialistes en cette matière, loin de voir clairement le but à atteindre, ne sont même pas d'accord sur ce but.

A plusieurs reprises, d'abord au congrès de naturalistes allemands en 1901, puis au 5e congrès international de chimie appliquée à Berlin en 1903, J. Wagner, qui s'est distingué par ses remarquables travaux sur les questions titrimétriques, a insisté sur ce qu'il s'agit d'établir des règles générales pour l'examen des substances types, et non de recommander des substances déterminées. Par contre, il trouve désirable de fixer pour chaque cas spécial une prescription générale et obligatoire pour la préparation à l'état pur de toute une série de substances types. Pour les déterminations acidimétriques et alcalimétriques, par exemple, il n'indique pas moins de 9 substances.

O. Kühling[2]) estime pourtant que c'est aller un peu trop loin et, en conséquence, propose, entre les substances disponibles, de faire un choix se réduisant au plus petit nombre possible, et de leur donner la désignation «*étalons officiels*».

[1]) Ce mémoire a été publié en allemand dans la Zeitschr. für anal. Chemie **44**, 141 (1905).

[2]) V. internationaler Kongress für angewandte Chemie zu Berlin. 1903. Bericht I, 325.

La proposition de Kuhling se rapproche de ce qui avait été à l'origine posé comme le but des travaux de la Commission internationale pour les analyses et que le président de cette commission, Monsieur le professeur G. Lunge à Zurich, et son secrétaire d'alors, Monsieur le professeur Lindet à Paris, exprimaient comme suit dans leur première lettre circulaire (juin 1902) aux membres de la commission: «Le but que la commission a à poursuivre consiste à établir dans les branches essentielles de l'analyse industrielle des méthodes normales qui trouveront leur emploi dans les cas douteux et spécialement dans les cas d'opinions divergentes entre chimistes, afin d'éviter entre les chimistes des querelles provenant de l'emploi de méthodes différentes. Dans ce but il faudrait déterminer pour chaque cas spécial une seule[1]) méthode, et par conséquent celle qui est reconnue actuellement pour chaque cas comme la plus rationnelle».

Le point de vue auquel se sont placés MM. Lunge et Lindet, me semble être le seul logique. En effet, il ne peut guère y avoir de doute qu'il n'y ait un très grand nombre de substances types à l'aide desquelles on peut étalonner, par exemple, un acide ou une base avec assez de précision, voire même d'une manière si précise que l'écart de la valeur vraie ne s'élèverait pas à plus de 2 à 3 pour mille; mais il est tout aussi peu douteux qu'on peut citer des raisons valables pour faire un choix parmi ces substances. Ainsi il est évident, je pense, qu'une substance dont la préparation serait difficile ou très coûteuse, ou qu'il ne serait guère possible de conserver sans altération, ne serait pas propre à servir d'étalon; de même il ne peut naturellement être question de substances dont l'emploi demande des opérations compliquées.

Mais, indépendamment de ces considérations, il faut remarquer que chaque substance type est susceptible de donner lieu à des erreurs de nature et d'importance différentes, qui se manifesteront toujours par des discordances plus ou moins grandes entre les résultats donnés par les différentes substances. Selon moi, la première tâche de la commission devrait consister à choisir, entre les diverses substances dont il peut être question, celle qui se rapproche le plus de l'idéal. Une pareille substance type devrait être facile à préparer, sa pureté facile à contrôler

[1]) Souligné par MM. Lunge et Lindet.

sous tous les rapports; de plus, il faudrait qu'elle puisse se conserver sans s'altérer; et enfin, son emploi, tout en n'exigeant que des opérations simples, devrait pouvoir fournir les déterminations les plus exactes.

Il est peu probable qu'il puisse être possible de procurer dans tous les cas cette substance idéale *(étalon)*. Le choix dépendra en première ligne des exigences sur lesquelles on peut le plus facilement céder. A ce propos, il me semble évident

1° qu'avant toute chose, la pureté de la substance doit pouvoir être contrôlée, et que celle-ci doit se conserver inaltérée, tandis que le mode plus ou moins compliqué de préparation est de moindre importance;

2° qu'il faut aspirer à la plus grande précision possible, même si les opérations en devaient devenir plus compliquées.

En effet, il ne s'agit pas d'élaborer des méthodes obligatoires pour l'usage journalier des industriels et qui, conséquemment, devraient avant tout être simples, mais seulement des méthodes propres à servir lorsqu'il s'agit de vider des différends. Je dois me ranger à l'avis exprimé par MM. Lunge et Lindet dans leur circulaire citée ci-dessus:

«Il est à peine besoin de dire qu'il ne s'agit pas en cette occasion d'établir des règles pour le contrôle chimique intérieur d'une fabrication ou pour l'usage obligatoire des analystes de commerce. Que chacun emploie les méthodes qui lui paraissent les plus sûres et les plus rationnelles. Même en cas de conflit entre deux adversaires, ceux-ci pourront s'entendre après comme avant sur des méthodes quelconques, différentes de celles proposées par notre commission; pourtant il est d'une valeur incontestable si de la part d'une commission internationale, on établit des règles auxquelles on pourra s'adresser sans autres en cas de litige, et qu'on pourra imposer directement aux chimistes des deux parties en cas de manque d'entente.»

En de pareils cas de conflit, il serait tout à fait faux de recommander plus d'une méthode; mais, en retour, celle-ci devra se rapprocher de l'idéal autant que possible.

Une double question se rattache étroitement a ce que nous venons de dire. Elle se rapporte, d'un côté, à la pureté de la substance type et, de l'autre, à la question de savoir jusqu'à quel point cette substance peut servir. Wagner s'est prononcé

là-dessus comme suit, au cours d'une conférence faite devant le congrès des naturalistes allemands en 1901[1]):

«Handelt es sich nur darum, ein bestimmtes Präparat auf Reinheit zu prüfen, nachdem die Brauchbarkeit des Stoffes selbst festgestellt ist, dann genügt es wohl stets einen Teil des Präparat in geeigneter Weise umzulösen — also umzukristallisieren oder umzufällen — und das umgeloste und das ursprüngliche Präparat je zu einer Titerstellung zu verwenden. Ergibt sich Identität, so war das Präparat rein. Eine derartige Prüfung ist auch bei sogenannten garantiert reinen Stoffen auszuführen und bei der Auswahl von Titersubstanzen deshalb einigermassen darauf zu achten, dass eine derartige Prüfung leicht ausführbar ist.

Will man feststellen, ob ein Stoff zur Titerstellung überhaupt brauchbar ist, dann genügt diese einfache Prüfung nicht, sie muss aber selbstverständlich vorausgehen. Vielmehr ist dann zunächst nötig ein Vergleich mit einem ähnlich wirkenden Stoff, also mussen zum Beispiel Jodate mit Bromaten verglichen werden, verschiedene Säuren unter sich und so weiter. Aber auch diese Prüfung gibt uns keine Sicherheit, denn wir sehen, dass Chromat einerseits, Jodat und Bromat andererseits verschieden wirksam sind, und der einfache Vergleich zeigt nicht, wo der rigtige Wert sich findet.

Deshalb ist in zweifelhaften Fällen, also für jede massanalytische Gruppe mindestens einmal, ein weiterer Vergleich nötig, und zwar durch solche Titersubstanzen, die durch zwei verschiedene Methoden nach zwei Richtungen geprüft werden können. Hierfur eignet sich zum Beispiel Kaliumtetroxalat, das alkalimetrisch und oxydimetrisch, Kaliumbijodat, das alkalimetrisch und jodometrisch bestimmbar ist.»

Se basant sur les considérations que nous venons de citer, Wagner, lors du 5e Congrès international de chimie appliquée a Berlin en 1903, termina sa conférence sur «Einheitliche Titersubstanzen» en avançant, entre autres, la thèse suivante:

«Die Reinheit oder der Wirkungswert eines zur Titerstellung benutzten Stoffes muss durch Vergleich mit zwei anderen derartigen Stoffen festgestellt werden. Es ist nicht nötig, dass dies in derselben Reaktion geschieht. So könnte KHJ_2O_6 alkalimetrisch mit Tetroxalat, jodometrisch mit Kaliumbromat verglichen werden.»

[1] Abteilung für angewandte Chemie, einschliesslich Agrikulturchemie etc. p. 183.

On voit par là que les recherches de Wagner sont toujours basées sur des comparaisons; en d'autres mots, elles ne donnent jamais la certitude, jusqu'à quel point une substance type fournit des résultats exacts ou non: elles nous apprennent seulement si la substance considérée donne des résultats aussi exacts ou, si l'on veut, aussi inexacts que celle avec laquelle on la compare. Bien plus, il se pourra même que de cette manière on soit conduit à rejeter une substance réellement bonne parce qu'elle ne donne pas le même résultat que deux autres substances, qui peut-être sont moins appropriées mais également impures.

Ainsi, par exemple, une faible teneur en eau dans le biiodate potassique et un excès correspondant d'eau dans le tétroxalate (excès dépassant la proportion d'eau exprimée par la formule KHC_2O_4, $H_2C_2O_4$, $2\,H_2O$)[1]) auront pour conséquence que ces deux substances fourniront bien des résultats concordants, mais qui s'écarteront forcément de ceux auxquels on arriverait si l'on faisait usage d'une substance type pure anhydre et, en général, idéale. Je suis encore à comprendre comment, en s'appuyant sur un pareil accord, on serait en droit de préférer celles-là à celle-ci. Sans doute, on pourrait objecter que les conditions ci-dessus admises ne se trouveront, en général, pas remplies; car si l'on compare entre elles trois substances types préparées avec le même soin, et si deux d'entre elles donnent des résultats concordants, tandis que la troisième conduirait à une valeur différente, — la supposition la plus vraisemblable sera, que c'est cette dernière substance qui est entachée de quelque défaut, et non les deux premières. Oui bien, c'est vraisemblable, mais c'est tout. Il ne peut pas être question d'aucune preuve, et voilà précisément en quoi consiste le défaut du système comparatif de Wagner.

Loin de moi l'intention de vouloir contester aux recherches comparatives la grande importance que sans aucun doute elles possèdent dans ce domaine aussi; seulement elles ne sont pas suffisantes pour former un fondement solide. Aussi bien il semble aller contre le sens même du mot *substance type* ou *étalon* que

[1]) Il n'est pas facile d'établir si, à l'exemple de tant d'autres substances anhydres (telles que chlorure, carbonate et oxalate sodiques), le biiodate potassique renferme un peu d'eau qui ne s'éliminerait pas par dessiccation à 100°; car ce corps est peut-être susceptible lui-même de céder de l'eau à des températures plus élevées; et, pour ce qui est du tétroxalate, sa teneur en eau ne se laisse déterminer que par une analyse quantitative.

de vouloir etablir l'applicabilité d'une telle substance en la comparant avec une autre dont il faut démontrer la bonté d'une façon tout a fait analogue. Contrairement à cela, il me semble qu'une substance type doit pouvoir, pour ainsi dire, marcher toute seule, en sorte que sa pureté et sa bonté doivent pouvoir être établies independamment de celles d'autres substances applicables au même but.

Nous allons nous occuper d'abord de la recherche de la pureté, laquelle doit se renouveler lors de chaque nouvelle préparation de la substance type en question. Pour qu'une substance soit propre a servir d'étalon, il faut, à mon avis, qu'il soit possible d'en démontrer la pureté par de simples épreuves qualitatives dont on connait la valeur quantitative, ou, pour mieux dire, il faut pouvoir démontrer que des impuretés n'y existent qu'en proportions si minimes que l'erreur en provenant sera non seulement plus petite que celle tolérée dans un titrage ordinaire, mais si insignifiante, qu'en comparaison de celle provenant du titrage elle sera pour ainsi dire nulle. En effet, il ne faut pas oublier que, si l'erreur de titrage peut dans une certaine mesure être réduite en opérant un plus grand nombre d'essais, il n'en est plus de même d'une erreur qui proviendrait de la composition de la substance type. De pareilles erreurs se reproduisent toujours dans un même sens, ce qui pourra facilement avoir pour conséquence qu'elles viendront s'ajouter à l'erreur de titrage proprement dite. En conséquence, les épreuves qui serviront à la recherche des impuretés, devront être plus rigoureuses qu'une détermination quantitative ordinaire, gravimétrique ou volumétrique; car dans les dosages ordinaires l'erreur monte facilement a 1 a 2 pour mille, de sorte que dans ces déterminations-là il est impossible d'établir avec toute la précision désirable le degré de pureté de la substance type.

Par conséquent, en faisant le choix de la substance type, il faut necessairement prendre en considération s'il est possible de s'assurer de sa pureté au moyen d'épreuves qualitatives convenables. Nous allons donner quelques exemples de ce genre d'épreuves:

a. Lorsqu'il s'agit, par ex., de démontrer dans du carbonate de sodium une teneur possible en chlorure de sodium, chacun sait comment se fait cette démonstration. Il est également très

facile de se renseigner sur la valeur quantitative de cette épreuve qualitative. Si l'on fait recristalliser du nitrate de sodium jusqu'à disparition de toute réaction de chlore, et encore deux ou trois fois, on peut, sans aucun doute, admettre qu'il est parfaitement exempt de chlore et d'acide sulfurique. Si l'on dissout $3^{gr},2$ de nitrate sodique (répondant à 2 gr. de carbonate anhydre) dans 20 cc. d'eau aiguisée d'un peu d'acide nitrique, puis qu'on ajoute $0^{mgr},1$ de chlorure sodique, on constatera qu'une addition subséquente de nitrate d'argent provoquera un trouble très marqué, si pas immédiatement du moins dans l'espace de quelques minutes. De même, après addition de $0^{mgr},6$ de sulfate sodique anhydre, la solution donnera avec le chlorure de baryum, au bout d'une heure de repos, une réaction très accusée d'acide sulfurique.

Cela étant, nous pouvons donc en conclure qu'un échantillon de carbonate de sodium qui, avec le nitrate d'argent ou le chlorure de baryum, ne donne pas de réaction de chlore ou d'acide sulfurique quand on en dissout 2 grammes dans un petit excès d'acide nitrique et qu'ensuite on étend avec de l'eau pour faire 20 cc., contient moins de $^1/_{20000}$ de chlorure sodique ou $^1/_{3300}$ de sulfate sodique.

Il va sans dire que l'on est à même, à volonté, de rendre ces épreuves plus rigoureuses en employant de plus fortes doses de matière ou de plus faibles proportions d'eau; les chiffres que nous avons cités ne sont destinés qu'à servir d'exemple, et ne sont, bien entendu, exacts que si l'épreuve est effectuée exactement d'après les indications données.

b. Lorsqu'il s'agit de vérifier si un sel normal, c'est-à-dire ni acide ni basique, est réellement de composition normale, la chose se présente, en général, d'une façon tout aussi simple. Le chlorure sodique pur, par exemple, dissous dans de l'eau bouillie, puis refroidie dans un courant d'air pur et privé d'acide carbonique, présente une réaction neutre vis-à-vis de la phénolphtaléine; mais que l'on ajoute une seule goutte d'une lessive de soude normale au $^1/_{10}$ à une telle solution de 10 gr. de chlorure sodique dans 150 cc. d'eau, il se produira une coloration rouge distincte quoique faible[1]).

[1]) Après dissolution de 10 gr. de chlorure sodique dans 300 cc. d'eau distillée, on ajoute quelques gouttes d'une solution de phénolphtaléine, puis on fait évaporer la solution dans un matras en verre d'Iéna (préalablement bien traité

On peut en conclure que, lorsqu'un échantillon de chlorure de sodium se comporte de la manière que nous venons d'exposer, la quantité d'acide libre qui y existe, doit être inférieure à celle qui repond a une goutte de lessive normale au $^1/_{10}$ de soude, c'est-a-dire $^1/_{20} \times 3^{mgr},65 =$ env. $0^{mgr},2$ de chlorure d'hydrogène, ce qui fait $^1/_{50000}$ de la quantité totale de chlorure sodique. Si la teinte légèrement rouge ne se produit pas par une seule goutte, mais seulement par deux gouttes de lessive, il faut en tirer la conclusion que le chlorure sodique renferme bien de l'acide libre, mais que la proportion de celui-ci ne dépasse pas environ $^1/_{25000}$ de ce chlorure, et ainsi de suite. Aussi longtemps qu'il s'agit seulement de toutes petites proportions d'acide — ou, en d'autres cas, de base —, une telle épreuve qualitative soigneusement faite nous renseignera sur le degré de pureté de la substance examinée sous ce rapport, renseignement dont la précision ne pourra jamais être égalée par une analyse quantitative proprement dite.

Dans d'autres cas un sel normal ne se laisse pas ainsi examiner au point de vue de ses impuretés acides ou basiques sans précautions spéciales, différentes pour les différents corps. A ce propos je dois renvoyer au procédé élaboré par moi pour la recherche de l'oxalate sodique normal relativement au carbonate sodique ou a l'oxalate sodique acide[1]), ainsi qu'à la méthode employée par A. C. Andersen et moi[2]) pour déceler de l'hydroxyde ou du carbonate acide sodiques dans le carbonate sodique normal.

à l'eau bouillante) en y faisant passer un courant d'air pur et débarrassé d'acide carbonique (par un double lavage avec une lessive de potasse, puis avec de l'acide sulfurique et de l'eau) jusqu'à 150 cc., après quoi on laisse refroidir, en continuant le courant d'air privé d'acide carbonique.

Si l'eau employée n'est pas complètement exempte d'alcali, ou que par suite de l'ébullition prolongée le matras ait cédé des matières alcalines, il peut arriver qu'après ébullition et refroidissement, la solution ait pris une teinte d'un rouge faible, même sans qu'elle ait reçu d'addition de soude; mais elle redeviendra incolore dès qu'on y ajoutera une goutte d'acide chlorhydrique normal au $^1/_{10}$. Que cette coloration ne provienne pas d'une teneur d'alcali dans le chlorure sodique, c'est ce qui appert de ce fait que la même teinte se produit aussi sans chlorure sodique, c'est-à-dire en présence de l'eau seule (Comparez, du reste, le beau travail de Küster: Ueber die Festlegung des Neutralisationspunktes durch Leitfähigkeitsmessung. Zeitschr. für anorg. Chemie **35**, 454 (1903)).

[1]) Bull. de l'Acad. Royale de Danemark 1900 p. 211. Ces mêmes Comptes-rendus, **9**, 135.

[2]) Ces mêmes Comptes-rendus **9**, 140.

Il résulte de ce qui précède que tous les sels acides ou basiques sont, selon moi, impropres à servir d'étalons; car il n'est possible de déterminer si un pareil sel est réellement composé comme il doit l'être qu'à l'aide d'une analyse quantitative.

c. Il est d'une grande importance de savoir si la substance considérée renferme ou non de l'eau. Il est vrai que par dessiccation à 100° on est à même d'éliminer totalement l'eau hygroscopique; mais, d'autre part, les corps dépourvus d'eau de cristallisation renferment, on le sait, très fréquemment de l'eau dite de crépitation, laquelle ne s'élimine pas a 100°. Afin de montrer quelles sont les quantités, en poids, d'eau de crépitation avec lesquelles on aura affaire, et à quelle température elle peut être expulsée, je citerai un essai que j'ai effectué, il y a quelques années, dans un but d'ordre hydrographique[1]).

Après avoir pesé exactement, dans un petit verre bouché à l'éméri, 5 à 6 grammes de chlorure sodique anhydre et pur, on y versa de l'eau pure, puis la solution ainsi obtenue fut évaporée à siccité dans un séchoir électriquement chauffé. Après 4 heures de dessiccation à 180° à 250°, le résidu se trouva contenir encore ..... $1^{mgr},9$
après encore 12^h à 180° à 250°.... $1^{mgr},4$
— — - - 295° à 300°.... $0^{mgr},9$
— — - - 295° à 300°.... $0^{mgr},7$

} d'eau de crépitation par gramme de sel.

Au bout d'encore 12^h à environ 380°, le poids était constant.

Quant à la teneur en eau de crépitation de l'oxalate sodique, nous en parlerons plus loin (v. p. 136).

Des proportions d'eau même tout à fait minimes se laissent heureusement déceler avec facilité dans les substances qui, portées au rouge, ne subissent pas de décomposition avec élimination d'eau, telles que le chlorure sodique ci-dessus mentionné, ou les oxalate et carbonate sodiques. En effet, si dans une éprouvette longue préalablement chauffée au rouge et puis refroidie à l'air sec, on introduit une quantité convenable du corps à examiner (quantité qui doit être en proportion du degré de précision que l'épreuve doit avoir), puis qu'on chauffe la partie inférieure de l'éprouvette jusqu'au rouge naissant, on verra que des proportions

[1]) Berichte über die Konstantenbestimmung zur Aufstellung der hydrographischen Tabellen von Carl Forch, Martin Knudsen und S. P. L. Sørensen, gesammelt von Martin Knudsen, Mém. de l'Acad. Royale des sciences et d. lettres de Danemark, 6e série, XII vol., no 1, p. 121 (1902).

d'eau même tres minimes — de beaucoup moindres qu'on ne le suppose généralement — manifesteront leur présence sous la forme de buée à la partie supérieure de l'éprouvette.

Il va sans dire qu'il faut déterminer pour chaque corps en particulier, le minimum d'eau qu'on sera à même de déceler par ce procédé. Pour y parvenir, il n'y aura guère d'autre moyen que de dessecher une forte dose du corps en question à des temperatures de plus en plus élevees, tout en vérifiant s'il est encore possible de reconnaitre la présence d'eau par le procédé decrit ci-dessus. A-t-on atteint le point où l'on peut juste encore remarquer une trace d'eau, c'est le moment de faire le dosage de l'eau aussi exactement que possible dans une grande portion de la substance desséchée.

Je sais fort bien qu'il me faut recourir ici à une détermination quantitative afin d'établir la valeur de l'épreuve qualitative, mais il est à remarquer, en premier lieu, que par là on sera en mesure de mettre en œuvre des quantités bien plus fortes que dans un dosage ordinaire et, d'un autre côté, il est possible d'apporter à cette determination tous les soins possibles et le temps requis, parce qu'on n'a à l'effectuer qu'une seule fois et qu'on n'a pas besoin de la répéter chaque fois que l'on a préparé une nouvelle portion de la substance. On verra donc que ce dosage d'eau viendra s'ajouter aux autres recherches de genres divers qu'il faut effectuer une fois pour toutes lorsqu'il s'agit de s'assurer si le corps reconnu pur sous tous les autres rapports est propre a servir d'étalon. En ce qui concerne la marche à suivre lors de pareilles recherches, nous en dirons quelques mots à la fin de ce mémoire.

A titre d'exemple, je vais citer quelques chiffres que j'ai trouvés en recherchant l'eau de crépitation contenue dans l'oxalate sodique. L'épreuve qualitative fut effectuée sur 5 gr. d'oxalate d'apres la méthode esquissée plus haut[1]). On a constaté que de l'oxalate sodique parfaitement pur à tous les autres points de vue

1° contenait encore après dessiccation à 125°, environ $^1/_{1000}$ de son poids d'eau; lors de l'épreuve qualitative, on pouvait observer abondamment de buée a la partie supérieure de l'éprouvette.

[1]) On en trouvera une description détaillée dans les Bull. de l'Acad. Royale des Sc. et d. L. de Danemark, 1900, p. 211, et dans les Comptes-rendus du Laboratoire de Carlsberg **9**, 136.

2° Après une dessiccation prolongée pendant plusieurs heures à 180° à 200°, il restait encore $^1/_{3000}$ d'eau, et l'épreuve qualitative accusa une formation de rosée bien nette.

3° Après dessiccation ultérieure pendant plusieurs heures à 200° à 210°, il restait encore environ $^1/_{5000}$ d'eau, et l'épreuve qualitative ne donna qu'une rosée faible, mais pourtant bien visible; — et

4° après encore plusieurs heures de dessiccation aux environs de 240°, le sel se montra pratiquement anhydre, la teneur en eau trouvée étant inférieure à $^1/_{10000}$ du poids du sel. Conformément à cela, l'épreuve qualitative ne fit observer aucune trace de formation de rosée.

J'en tire cette conclusion qu'un oxalate sodique qui à l'épreuve qualitative ne donne pas de trace de rosée, contient moins de $^1/_{5000}$ de son poids d'eau; l'oxalate sodique pur desséché à 240°, tel que le fournit C. A. F. Kahlbaum à Berlin, peut pleinement soutenir cette épreuve.

La valeur quantitative d'une épreuve qualitative relative à l'eau contenue dans d'autres substances types, se laisse naturellement établir d'une façon analogue; dès lors, le vrai sens de l'adjectif *anhydre* sera, par exemple: *à teneur d'eau inférieure à* $^1/_{5000}$ *du poids*, et ainsi de suite[1]).

De ce qui a été dit ci-dessus, il résulte qu'une substance doit être considérée comme impropre à servir d'étalon,

a. si elle contient de l'eau de cristallisation, de sorte que la teneur en eau ne pourrait être contrôlée que par un dosage ordinaire d'eau, —

b. si elle est de composition telle que portée au rouge elle peut se décomposer avec dégagement d'eau (par exemple, sels acides ou basiques, acides, la plupart des composées organiques), en sorte qu'une teneur possible en eau ne se laisserait pas facilement déceler.

Il va sans dire qu'il sera impossible d'examiner une sub-

[1]) Il y a longtemps déjà, j'ai signalé la grande importance qu'ont les épreuves qualitatives de pureté dont on connaît la valeur quantitative. Voir par ex. «Über die Darstellung reiner Nickel- und Cobaltverbindungen» (Zeitschr. für anorg. Chemie **5**, 354 [1893]); «Darstellung von reinen Strontianverbindungen» (Zeitschr. für anorg. Chemie **11**, 305 [1895], et «Om Renhedsprøver i Almindelighed, specielt om Fremstilling af og Prøver for rene Aluminiumsalte», conférence faite au congrès des naturalistes scandinaves à Stockholm, 1898 (Nyt Tidsskrift for Fysik og Kemi III, p. 268 [1898]).

stance type relativement a toutes les impuretés possibles qu'elle pourrait renfermer. On pourra bien toujours ne pas être d'accord sur le nombre et le genre des recherches à faire: à la fin, le choix dependra d'une appreciation personnelle. Mais il ne m'en semble pas moins inadmissible de rejeter les recherches qualitatives en général, ainsi que le fait Wagner en disant[1]):

«Qualitative Reaktionen sind auch wertlos, da deren Genauigkeitsgrenzen meist nicht bekannt sind, und man unmöglich auf jede denkbare Verunreinigung prüfen kann».

Quelle que soit la voie qu'on choisisse pour établir l'applicabilité d'une substance a quelque but spécial, toujours est-il que ce sera l'affaire de chacun d'apprécier l'étendue à donner à une telle recherche, ainsi que la manière de la faire. En effet, Wagner, en faisant la proposition de vérifier la valeur d'une substance comme étalon en la comparant avec deux autres substances analogues, a lui-même fait un choix; car son principe ne se trouverait pas violé, même si on préférait de comparer avec une ou avec trois ou même avec un nombre quelconque de substances types.

C'est pourquoi dans ce qui précède je n'ai pas voulu donner une description de toutes les épreuves qualitatives qu'il faut entreprendre lors de la recherche de la pureté d'une substance type: pour le procédé à adopter dans chaque cas particulier, il faut naturellement se guider sur la nature de la substance étudiée. J'ai seulement voulu montrer par des exemples typiques de cette catégorie de recherches, comment, selon moi, il faut procéder quand il s'agit de déterminer la pureté d'une substance type.

En ce qui concerne l'autre côté de l'affaire, à savoir la démonstration de la valeur comme étalon de la substance reconnue pure, je ne peux également pas partager la manière de voir avancée par Wagner. Il dit à ce sujet[2]):

«Diese Prüfung muss sich verschieden weit erstrecken, je nachdem es sich darum handelt, einen Stoff auf seine Brauchbarkeit als Titersubstanz zu prüfen, oder nur darum, ein bestimmtes Präparat eines bereit geprüften Stoffes im einzelnen Falle auf Reinheit zu untersuchen. Festzuhalten ist zunächst

[1]) A l'endroit cité, p. 183. [2]) A l'endroit cité, p. 182.

folgendes. Die Prüfung darf nur unter den Umständen erfolgen, wie der Gebrauch sie später mit sich bringt, Titersubstanzen dürfen nur massanalytisch geprüft werden; gewichtsanalytische und qualitative Prüfungen sind unbedingt auszuschliessen, sowohl bei der Prüfung von Titerstoffen als bei der Einstellung von Lösungen.»

Il est bien vrai qu'il faut distinguer nettement entre les épreuves relatives à la pureté d'une substance et, de l'autre côté, la recherche de sa propriété à servir d'étalon; mais non point seulement parce que

«die Prüfung sich verschieden weit erstrecken muss»,

mais aussi, et surtout, parce que cette dernière recherche poursuit un tout autre but que celle qui se rapporte à la pureté, et que, par conséquent, elle doit être effectuée d'une tout autre manière. La pureté doit être vérifiée chaque fois que l'on a préparé de nouveaux matériaux, et par suite, il ne doit pas être trop malaisé de la démontrer; ici les épreuves qualitatives ci-dessus mentionnées présentant un degré défini de précision, peuvent rendre de grands services. Pour savoir si une substance est propre à servir d'étalon, il suffit de l'examiner une fois pour toutes, et à cet effet on peut se servir de n'importe quelle méthode, pourvu qu'elle soit plus précise que les méthodes volumétriques usuelles.

Pour préciser ces indications nous allons citer quelques exemples.

S'il s'agit d'étalonner une solution de thiosulfate, on y parvient au moyen de l'iode, et l'on peut libérer celui-ci, par exemple, dans une solution acide d'iodure de potassium, à l'aide d'une quantité pesée d'un oxydant convenable. C'est donc ce dernier qui est à considérer comme la vraie substance type. Il va de soi qu'il faut au préable s'être assuré de la pureté de la substance en question. Mais il est tout aussi important de prouver que la réaction à laquelle donne lieu l'emploi de l'étalon, prend bien l'allure qu'elle doit avoir; c'est-à-dire que dans le cas spécial qui nous occupe, il faut démontrer qu'une quantité d'iode équivalente à la proportion d'oxygène actif contenue dans la dose pesée de la substance type est bien mise en liberté. Qu'il n'en soit pas toujours ainsi, c'est ce qui a été démontré, par exemple, par les belles recherches faites par Wagner à ce sujet[1]). L'étalon

[1]) Zeitschr. für anorg. Chemie, **19**, 427 (1898).

etudie ne pourra être considéré comme utilisable que si la réaction à laquelle elle donne lieu sera achevée au point que l'erreur commise sera sans conséquence auprès de l'erreur ordinaire de titrage. Or, il s'ensuit nécessairement que la méthode à suivre pour prouver la marche normale de la réaction, devra permettre d'obtenir une plus grande précision que celle fournie par une titration habituelle.

Il en est de même s'il s'agit, par exemple, d'étalonner un acide au moyen de l'oxalate de sodium: dans ce cas il est, bien entendu, également de la plus grande importance de pouvoir prouver que l'oxalate est pur sous tous les rapports; mais il est tout aussi important de pouvoir démontrer que lors du chauffage de l'oxalate, la transformation de celui-ci n'entraîne point de perte de sodium, ni par vaporisation, ni en forme de poussière, ni d'aucune autre maniere. Pour les mêmes raisons que celles indiquées à propos du précédent exemple, on comprend qu'on ne peut en donner des preuves qu'en employant un procédé qui permette d'obtenir un degré de précision tel que les défauts en résultant soient sans importance en comparaison de ceux inhérents à toute titration usuelle[1]).

Ma manière de voir en ce qui concerne la recherche de la purete et de l'applicabilité d'un étalon — et dans le présent memoire il ne s'agit que d'étalons, et non du grand nombre de substances types utilisées dans la pratique analytique journalière —, se laisse résumer comme suit:

a. La pureté d'un étalon doit être vérifiée au moyen d'épreuves qualitatives dont il faut déterminer exactement la valeur quantitative pour chaque étalon en particulier. Toute portion nouvelle d'une substance type doit naturellement être examinée au point de vue de sa pureté.

b. Quant à la question de savoir si une substance dont la pureté a été établie de la manière indiquée en *a*, peut se prêter à être employée comme étalon, il faut l'examiner de diverses manières, selon la nature des substances en question, examen qui devra permettre

[1]) Du reste, je dois renvoyer à mon mémoire souvent cité: Bull. de l'Acad. Royale de Sc. et de L. de Danemark, 1900, p. 189.

d'obtenir la plus grande précision possible et qui pourra être effectué une fois pour toutes.

Décembre 1904.

2. SUR L'EXAMEN DE L'OXALATE SODIQUE ET SUR SON EMPLOI DANS LES DOSAGES VOLUMÉTRIQUES[1].

PAR

S. P. L. SØRENSEN.

En 1896, j'ai proposé[2] d'employer l'oxalate de sodium comme substance type dans l'étalonnage des liqueurs normales (acides et solutions de permanganate potassique), et sur ma demande la maison C. A. F. Kahlbaum, à Berlin, à mis dans le commerce une préparation appropriée à ce but («Oxalsaures Natrium mit Alkohol gefällt, 7 Mark pro Kilo»). Cependant, grâce à une recherche assez approfondie faite par moi en 1900[3], j'ai pu montrer que l'oxalate sodique de Kahlbaum, desséché à une température comprise entre 125° et 150° d'après mes indications, renfermait encore une trace (0,09 pour cent) d'eau de crépitation, qu'on ne pouvait éliminer que par dessiccation du sel à 230° à 240°. Comme le sel Kahlbaum était excellent sous tous les autres rapports, j'ai prié cette maison de bien vouloir faire en sorte d'éviter ce défaut, et elle est maintenant en mesure de fournir un oxalate sodique en tous points satisfaisant («Oxalsaures Natrium, mit Alkohol gefällt, bei 240° C. getrocknet [Titereinstellung nach Sørensen]. Mark 8 pro Kilo»).

C'est pourquoi je crois utile d'indiquer la manière dont on peut essayer l'oxalate de sodium au point de vue des impuretés possibles. Pour ce qui concerne la valeur et l'importance de ces épreuves, je renvoie au mémoire détaillé que j'ai publié dans le Bulletin de l'Académie Royale de Danemark. Finalement, je donnerai une description, également sans autre explication, du procédé qu'il convient de suivre dans un étalonnage habituel d'un acide ou d'une solution de permanganate potassique au moyen de l'oxalate sodique.

[1]) Publié en 1903, en allemand, dans la Zeitschr. für anal. Chemie **42**, 512 (1903).

[2]) Nyt Tidsskrift for Fysik og Kemi I, p. 173 (1896).

[3]) Bulletin de l'Académie Royale de Danemark. 1900, p. 189.

On recherche dans l'oxalate sodique

1° l'eau [a) hygroscopique et b) de crépitation];

2° le carbonate de sodium ou l'oxalate sodique acide;

3° les impuretés inorganiques, et

4° les impuretés organiques.

1° Eau. L'oxalate sodique entièrement déshydraté n'est pas hygroscopique; mais au contact de l'air il se recouvre, comme les autres corps secs, d'une mince couche d'humidité, qu'on peut aisément faire disparaître par dessiccation dans une étuve ordinaire; l'eau de crépitation par contre, ne s'élimine qu'au-dessus de 200°.

a. Recherche d'eau hygroscopique. Par dessiccation dans l'étuve pendant vingt-quatre heures, 10 gr. de l'oxalate sodique pesé dans un verre à tare ordinaire (un verre analogue doit être séché simultanément et doit servir de tare dans tous les dosages) ne doivent pas perdre plus d'un milligramme ($^1/_{10000}$ du poids ; lorsque ensuite on fait séjourner l'oxalate au-dessus d'eau, il ne doit pas réabsorber plus d'un milligramme d'humidité[1]).

b. Recherche d'eau de crépitation. 5 gr. de l'échantillon sont introduits dans une éprouvette étroite et bien propre, qu'on a préalablement portée au rouge et puis refroidie. Après l'avoir fait séjourner pendant une couple d'heures dans l'étuve à une température de 90° à 100°, on ferme l'éprouvette chaude avec un bouchon de liège muni d'un tube garni de chlorure de calcium, et l'on fait refroidir complètement. Si alors on chauffe avec précaution jusque vers le rouge, sur une flamme ouverte, la partie inférieure de l'éprouvette, il ne faut pas pouvoir observer trace de liquide à sa partie supérieure.

(Voir du reste le mémoire principal: Bulletin de l'Académie Royale de Danemark 1900, p. 206.)

2° Recherche de carbonate sodique ou d'oxalate sodique acide. En faisant barboter de l'air pur et exempt d'acide carbonique, on fait bouillir dans un matras conique en verre d'Iéna, 250 cc. d'eau et 10 gouttes de solution de phénolphtaléine ($^1/_2$ gr. de phénolphtaléine dissout dans 50 cc. d'alcool + 50 cc. d'eau). Après avoir ainsi réduit le volume à environ 180 cc., on fait refroidir jusqu'à la température ordinaire du laboratoire, et ensuite on ajoute 5 gr. d'oxalate de sodium, qui se dissout quoique lentement, quand on agite avec précaution, en faisant continuellement traverser le liquide par de l'air pur.

[1]) Voir ces mêmes Comptes-rendus p. 176.

Si la solution présente une couleur rouge, celle-ci doit disparaître par addition de 4 gouttes, au plus, d'acide chlorhydrique normal au $^1/_{10}$; si elle est incolore, la production d'une coloration rouge bien accusée ne doit pas exiger plus de 2 gouttes, au maximum, de lessive normale au $^1/_{10}$ de soude.

(Voir du reste: Bulletin de l'Académie Royale de Danemark 1900, p. 211).

3° Recherche d'impuretés inorganiques. L'oxalate sodique doit donner une solution aqueuse parfaitement limpide.

On fait décomposer 10 gr. d'oxalate dans un creuset en platine, préférablement à l'aide d'une lampe à alcool (le gaz d'éclairage contenant toujours du soufre); puis, après avoir dissous le carbonate ainsi obtenu dans de l'acide nitrique faible et exempt de chlore, on filtre la solution pour en séparer le charbon formé. Dans une moitié de la solution il ne faut alors pas pouvoir déceler d'acide chlorhydrique au moyen de nitrate d'argent; dans l'autre moitié le nitrate de baryum ne doit pas pouvoir révéler d'acide sulfurique.

Après avoir fait décomposer 10 gr. de l'oxalate dans un creuset de platine, on fait disparaître toute trace de charbon au moyen d'un brûleur à air comprimé. Le résidu, en se dissolvant dans l'eau chaude, doit donner une solution tout à fait limpide; tout au plus, il doit rester une trace à peine pondérable d'oxyde de fer. On filtre la solution si cela est nécessaire, et la sursature d'acide chlorhydrique autant que possible exempt de fer; ensuite on la fait évaporer dans une capsule en platine au bain-marie, et enfin on soumet le résidu à une dessiccation de deux heures a 120°. Il doit alors donner une solution aqueuse limpide remplissant les conditions suivantes:

a. Avec le rhodanure de potassium ne donner de réaction que pour une trace de fer;

b. avec une solution incolore de sulfure d'ammonium ne prendre qu'une teinte verdâtre et ne pas produire de dépôt;

c. en présence de cobaltinitrite de sodium, d'après le procédé de E. Biilmann[1]), ne pas donner de réaction pour le potassium.

(Voir du reste le Bulletin de l'Académie Royale de Danemark 1900, p. 215.)

4° Recherche d'impuretés organiques. Dans une

[1]) Zeitschr. für anal. Chemie, **39**. 284 (1900).

éprouvette bien propre et préalablement portée au rouge, contenant 10 cc. d'acide sulfurique concentré pur et exempt de poussière, on chauffe 1 gr. de l'oxalate sodique, d'abord faiblement jusqu'à cessation de dégagement d'air, puis ensuite plus fortement jusqu'à ce que l'acide entre en ébullition. Après refroidissement, on compare la couleur de l'acide sulfurique avec celle de 10 cc. du même acide soumis au même traitement mais sans addition d'oxalate sodique. Le sel ne devra communiquer à l'acide sulfurique qu'une teinte très légèrement brunâtre.

(Voir du reste le Bulletin de l'Académie Royale de Danemark 1900, p. 216.)

Etalonnage d'un acide au moyen d'oxalate de sodium. Supposons que nous ayons un acide d'un titre approximativement connu, et une lessive de soude dont nous connaissions le titre par rapport à l'acide.

Il convient de peser l'oxalate sodique dans un petit verre à tare, que l'on repese après avoir transvasé avec précaution le sel dans un creuset de platine muni d'un couvercle bien joignant. Si l'on veut éviter l'erreur qui pourrait provenir de la teneur du sel en eau hygroscopique (environ $^1/_{10000}$ du poids) — et qui du reste est sans conséquence pour tous les dosages ordinaires —, on n'a qu'à faire sécher pendant une couple d'heures à l'étuve le verre a tare chargé du sel, après quoi, avant de le peser, on le fera refroidir au-dessus du chlorure de calcium dans un exsiccateur.

La décomposition de l'oxalate peut s'effectuer aisément en chauffant avec précaution, pendant un quart d'heure à une demi-heure, le creuset couvert de son couvercle. Comme source de chaleur on peut se servir d'une petite flamme de gaz ordinaire; toutefois, si l'on veut éviter le soufre contenu dans le gaz d'éclairage, il vaut mieux employer une lampe à alcool Berzelius, munie d'une cheminée en terre glaise pareille à celle des lampes d'Argand. Le chauffage donne toujours naissance à un peu de charbon: pour le faire disparaître, on chauffe le creuset à moitié recouvert jusqu'à ce que le carbonate sodique commence à entrer en fusion; par ce moyen le charbon est consumé.

Entretemps on aura mesuré dans un long gobelet une dose d'acide un peu plus forte que celle répondant à l'oxalate pesé. Lorsque le creuset est refroidi, on le place debout avec son contenu, qui se compose de carbonate de sodium et d'un peu

d'hydroxyde sodique, dans l'acide renfermé dans le gobelet, et on met le couvercle à côté du creuset. A l'aide d'une pipette, le contenu du creuset est complètement imbibé d'eau, de manière à ce qu'on n'ait plus à craindre qu'une partie du contenu se perde en forme de poussière par suite d'un brusque dégagement d'acide carbonique; ensuite on recouvre le gobelet d'un verre de montre, et on le penche de façon que l'acide puisse couler dans le creuset. Lorsque tout le contenu du creuset est entré en dissolution et que la majeure partie de l'acide carbonique formé a été expulsée par chauffage au bain-marie, on transvase la totalité de la liqueur dans un matras conique, en passant soigneusement à l'eau le creuset, le couvercle, le gobelet et le verre de montre. Après addition de l'indicateur (j'ai toujours employé 10 gouttes de la solution de phénolphtaléine mentionnée plus haut), on chasse entièrement par ébullition l'acide carbonique, on fait refroidir a l'eau froide, et enfin on fait le titrage de l'excès d'acide à l'aide de la lessive de soude, comme à l'ordinaire.

(Voir du reste le Bulletin de l'Académie Royale de Danemark 1900, p. 191 et suivantes.)

Etalonnage d'une solution de permanganate de potassium à l'aide de l'oxalate de sodium.

L'oxalate de sodium ayant été pesé de la manière précédemment décrite, on transvase le sel dans un matras et le dissout dans de l'eau, après quoi la titration est effectuée en liqueur sulfurique par le procédé habituel.

Comme l'équivalent de l'oxalate de sodium est de $\frac{134,1}{2} = 67,05$, il s'ensuit que 10 cc. d'une solution normale au $^1/_{10}$ d'acide ou de permanganate de potassium répondent à $67^{mgr},05$ d'oxalate de sodium, et que

$0^{gr},1$ d'oxalate sodique répond à $14^{cc},91$ d'une solution normale au $^1/_{10}$ d'acide ou de permanganate potassique.

3. DE L'EMPLOI DES CARBONATE ET OXALATE SODIQUES COMME ÉTALON EN ACIDIMÉTRIE

PAR

S. P. L. SØRENSEN ET A. C. ANDERSEN[1]).

Au 5e congrès international de chimie appliquée à Berlin en 1903, G. Lunge a soumis une série de recherches volumétriques, et celles-ci, augmentées de plusieurs recherches analogues, ont été publiées dans la «Zeitschrift für angewandte Chemie»[2]) sous le titre de «Beiträge zur chemisch-technischen Analyse». Le troisième chapitre de ce mémoire, chapitre intitulé «Ursubstanzen für Alkalimetrie und Azidimetrie», contient une comparaison entre le biiodate de potassium, le tétroxalate de potassium, l'oxalate de sodium et le soude, au point de vue de la possibilité de les appliquer au but indiqué. Lunge a résumé ainsi le résultat de ces recherches:

Il déclare que le carbonate de sodium est l'étalon le plus sûr et le plus précis (tout comme aussi le meilleur marché); par contre, il rejette les biiodate et tétroxalate potassiques, tandis que sur l'oxalate sodique il s'exprime comme suit:

«Das nach Sørensen's Vorschrift von Kahlbaum hergestellte, wasserfreie Natriumoxalat ist eine Ursubstanz von zuverlässigem Werte, welche, bei einiger Übung und sorgfältigster Einhaltung der oben für seine Umwandlung in Natriumcarbonat gegebenen Vorschriften, richtige Ergebnisse liefert und nach meiner Ansicht dem Kaliumtetroxalat oder Kaliumbijodat, so wie allen anderen mir bekannten Ursubstanzen, mit Ausnahme der Soda, vorzuziehen ist.»

Cette appréciation sur la valeur de l'oxalate sodique est justifiée pour autant que, en employant ce sel comme substance type, Lunge arrive toujours à une valeur d'acide légèrement supérieure à celle obtenue dans ses essais relatifs à la soude, et que, d'autre part, ses essais sur l'oxalate sodique ne lui ont pas réussi aussi facilement qu'on pouvait s'y attendre d'après la description de Sørensen.

Il faut cependant y objecter, d'abord, qu'on ne peut pas dire d'avance que le résultat obtenu au moyen du carbonate sodique

[1]) Publié en allemand, en 1905, dans la Zeitschr. für anal. Chemie, **44**, p. 156.
[2]) **17**, pp. 195, 225 et 265 (1904).

soit le bon; on pourrait dire à aussi bon droit que c'est l'oxalate sodique qui fournit la vraie valeur d'acide, et que, au contraire, le carbonate donne toujours un chiffre un peu trop bas (parce que par exemple, il aura abandonné un peu d'acide carbonique lors de la dessiccation). Deuxièmement, il ressort de la description de Lunge, que dans la transformation d'oxalate sodique en carbonate, il a eu à combattre des difficultés que nous ne connaissons point, et c'est pourquoi nous estimons que sa manière d'opérer a besoin de modification pour donner des résultats exacts.

Etant d'accord avec Lunge sur le fait que, de toutes les substances types connues en acidimétrie et en alcalimétrie, les carbonate et oxalate sodiques fournissent les résultats les plus sûrs, il nous semble qu'une comparaison entre ces deux étalons offre un grand intérêt; et si le résultat obtenu par Lunge, savoir que l'oxalate sodique donne constamment une valeur d'acide d'environ $^1/_{1000}$ plus grande que celle fournie par le carbonate, il est évident qu'il faut trouver la cause de cet écart avant de pouvoir choisir une des deux substances comme étalon.

Nous avons procédé à une telle comparaison, et le résultat principal de nos recherches peut être résumé comme suit:

1° L'étalonnage d'un acide avec l'oxalate sodique comme étalon, n'offre point de difficulté. La décomposition de l'oxalate peut se faire de manières très différentes sans que le résultat en change; seulement, il faut toujours avoir soin d'employer comme source de chaleur une lampe à alcool, puisque le soufre du gaz d'éclairage est apte à amener une erreur considérable.

2° En étalonnant un acide à l'aide du carbonate sodique desséché d'après Lunge, on arrive à presque le même résultat que celui obtenu au moyen de l'oxalate; l'écart n'atteint jamais la grandeur trouvée par Lunge: 0,1 %, et il provient principalement de ce que, par dessiccation d'après Lunge, le carbonate abandonne un peu d'acide carbonique ou, plus exactement, abandonne ordinairement un peu plus d'acide carbonique qu'il ne renferme encore d'eau.

Du carbonate sodique parfaitement pur, c'est-à-dire ne renfermant ni eau, ni bicarbonate, ni hydroxyde

ou oxyde) de sodium, ne peut probablement pas être préparé.

A. Mode opératoire.

Avant d'entrer dans les détails de nos résultats expérimentaux, nous croyons utile d'exposer brièvement les procédés que nous avons employés.

a. Etalonnage d'un acide à l'aide de l'oxalate sodique.

La recherche portait sur un acide chlorhydrique normal au $^1/_{10}$ environ, dont on connaissait approximativement la concentration et dont on avait déterminé le titre par rapport à une lessive de soude de concentration analogue.

On employait un oxalate sodique fourni par C. A. F. Kahlbaum a Berlin, et qui après dessiccation à 240° fut exposé à l'action de l'air atmosphérique (humide). Le sel fut reconnu comme étant résistant, et on l'employa tel quel (il renfermait $^1/_{12000}$ d'eau hygroscopique). On le pesait dans un petit flacon bouché à l'éméri, qu'on repesait après avoir transvasé le sel dans un creuset en platine muni d'un couvercle joignant assez bien.

On faisait la décomposition de l'oxalate en chauffant le creuset recouvert; mais cette décomposition se pratiquait de diverses manières et surtout avec des vitesses différentes, ainsi qu'il sera indiqué a propos de chaque essai en particulier.

Comme source de chaleur nous nous sommes toujours servis d'une lampe à alcool Berzelius, surmontée d'une cheminée en terre glaise à l'instar d'une lampe Argand ordinaire.

De l'acide renfermé dans la burette on tirait dans un long gobelet une portion légèrement plus considérable que celle répondant a l'oxalate pesé, puis on y plaça debout le creuset refroidi avec son couvercle à côté. Au moyen d'une pipette et avec précaution, on imprégnait d'eau le contenu du creuset, et ensuite le gobelet recouvert d'un verre de montre fut penché de façon à faire couler l'acide dans le creuset. Lorsque la totalité du carbonate sodique eut été dissout et que la majeure partie de l'acide carbonique eut été chassée par chauffage au bain-marie, on transvasait la liqueur dans une fiole conique, puis rinçait soigneusement le creuset, le couvercle, le gobelet et le verre de montre. Après addition de 10 gouttes de solution de phénolphtaléine $0^{gr},5$ de phénolphtaléine dissous dans 50 cc.

d'alcool + 50 cc. d'eau), la liqueur, dont le volume était d'environ 300 cc., fut réduite à 200 cc. dans un courant d'air pur et exempt d'acide carbonique. Ensuite on fait refroidir dans de l'eau, tout en continuant à faire passer de l'air privé d'acide carbonique, et finalement on titre au moyen de la lessive de soude jusqu'à coloration légèrement rouge. Une goutte de cette lessive donne alors un virage bien accusé.

Les burettes employées, qui contenaient 100 cc. et qui étaient composées d'une boule de 50 cc. et d'un tube divisé en dixièmes de centimètre cube) avaient été exactement calibrées, en admettant que la boule de la burette à l'acide renfermait précisément 50 cc.; en conséquence, les corrections furent insignifiantes. Du reste, on constata que le vrai volume n'était pas de 50 cc., mais de $50^{cc},206$ (à 20^0), écart qui est évidemment sans conséquence pour la comparaison en question, mais qui doit être pris en considération lors d'un essai que nous avons fait dans un autre sens et que nous relaterons dans la dernière partie du présent mémoire (voir p. 163). Toutes les lectures de burette étaient rapportées, au moyen d'une correction, à une même température: 20^0. On se servait des pinces «Göckel».

En ce qui concerne l'appréciation de l'exactitude de ce procédé, il faut remarquer ce qui suit:

Le pesage de l'oxalate sodique peut deux fois occasionner une erreur de $0^{mgr},1$; en proportion de la totalité de l'oxalate qu'on a pesé (environ $0^{gr},5$), cela fait $^1/_{2500}$ environ.

Dans la titration, la lecture de la burette doit se faire 4 fois; si nous posons l'erreur de lecture égale à $0^{cc},01$ chaque fois, ces 4 lectures peuvent donner lieu à une erreur de $0^{cc},04$; il vient encore s'en ajouter une d'une goutte au maximum ($0^{cc}.05$) à la fin de la titration (virage), soit, en tout, $0^{cc},09$; ce qui fait approximativement $^1/_{900}$ par rapport à la totalité de l'acide mis en œuvre (environ 80 cc.). En conséquence, si la méthode en elle-même n'entraîne pas d'erreur (due, par exemple, aux différentes méthodes de décomposition du sel), chaque essai ne doit pas s'écarter de plus de $^1/_{2500} + ^1/_{900} =$ env. $^1/_{666}$ de la moyenne de toutes les déterminations réunies. Nous allons démontrer que le plus grand écart de la moyenne est bien loin d'atteindre cette grandeur, et que, ordinairement, les écarts sont à peu près nuls.

Mais nous avons encore quelques observations à faire: Dans le mémoire cité Lunge dit (p. 231):

«Es ist nun gar nicht abzusehen, warum Sørensen sein Verfahren dadurch erheblich kompliziert und verlängert, dass er die Titration mit Phenolphtalein vornimmt, was das lange Kochen der angesauerten Lösung und sonstige Übelstände nach sich zieht. Hier ist doch wahrlich die Anwendung von Methylorange am Platze.»

A ceci nous pouvons objecter que c'est une question à part que de savoir si dans un étalonnage ordinaire d'acide il faut préférer le methylorange, la phénolphtaléine, ou peut-être même un autre indicateur, et naturellement à ce point de vue le carbonate et l'oxalate sodiques se comportent tout à fait de la même façon. Mais lors d'une comparaison entre ces deux sels, où il s'agit d'exclure toutes les sources d'erreurs autres que celles provenant des substances à comparer, le seul motif qui doive nous guider dans le choix d'un indicateur doit être le désir d'arriver au plus haut degré de précision, même si ce n'était possible qu'au prix d'un mode de travail plus compliqué. On ne peut manquer d'admettre avec nous que, pourvu que l'acide carbonique soit expulsé complètement, une titration à la phénolphtaléine peut se faire avec une exactitude beaucoup plus grande que celle que le méthylorange permet d'obtenir; c'est pourquoi nous nous sommes servis de la phénolphtaléine dans ce travail-ci, de même que l'un de nous l'a fait déja antérieurement[1]). Nous consacrerons, d'ailleurs, un chapitre ultérieur à cette question relative aux indicateurs.

Nous avons effectué la titration en retour au moyen de la lessive de soude, et nous savons bien que l'acide carbonique y contenu peut donner lieu à une erreur; même un seul essai et un simple calcul feront cependant voir combien insignifiante est cette erreur.

Essai: 300 cc. d'eau furent, comme à l'ordinaire, réduits à 200 cc. dans de l'air privé d'acide carbonique, ensuite on y ajouta 5 gr. de chlorure de baryum pur[2]), de la solution de phénolphtaléine et la lessive de soude, et puis on y versa de l'acide chlorhydrique jusqu'à décoloration, et enfin de la lessive de soude jusqu'à apparition d'une couleur légèrement rouge. $60^{cc},4$ de lessive de soude exigèrent $60^{cc},1$ d'acide chlorhydrique.

Ainsi qu'on le verra dans la suite (voir p. 149), $60^{cc},4$ de lessive de soude répondent a $62^{cc},3$ d'acide chlorhydrique lors-

[1]) S. P. L. Sørensen: Om Anvendelse af normalt Natriumoxalat i Titreranalysen. Bulletin de l'Académie Royale de Danemark 1900, p. 189.

[2]) Comparez: F. W. Küster: Zeitschr. für anorg. Chemie, **13**, 127 (1896).

que tout l'acide carbonique est chassé; la teneur en acide carbonique des 60cc,4 de lessive de soude correspond alors au déficit d'acide chlorhydrique: 2cc,2, chiffre qui représente une valeur maximale, puisque l'acide chlorhydrique employé n'est pas exempt d'acide carbonique ni lui non plus.

Comme le feront voir les tableaux joints au présent mémoire, nous avons dans chaque titration mis en œuvre environ 1/2 cc. de lessive de soude; l'acide carbonique qu'elle renferme correspond donc, au plus, à 0cc,018 d'acide chlorhydrique. Ajoutez encore à cela que dans une titration usuelle effectuée sans addition de chlorure de baryum, l'acide carbonique n'agit que comme un acide monobasique vis-à-vis de la phénolphtaléine, c'est-à-dire que l'acide carbonique faisant partie de 1/2 cc. de lessive de soude, ne répond qu'à 0cc,009, au maximum, d'acide chlorhydrique, ce qui fait environ 1/9000 de la totalité de l'acide utilisé (env. 80 cc.). Par conséquent, l'erreur absolue due à la teneur en acide carbonique de la lessive de soude, représente tout au plus 1/9000, de sorte que la différence entre les erreurs des divers essais sera sans aucune influence sur les résultats, — et c'est cette différence seule qui pourra entrer en ligne de compte dans cette recherche comparative.

b. Etalonnage d'acides au moyen du carbonate de sodium.

On mit en œuvre plusieurs échantillons de carbonate sodique exempts de chlore et de sulfate et ayant chacun une teneur différente en eau. La dessiccation fut effectuée dans un creuset de platine, en partie d'après Lunge, en partie par un procédé légèrement différent, ainsi qu'on le verra dans les tableaux suivants (voir p. 152). Après avoir fait refroidir le creuset dans l'exsiccateur, on pesa de suite trois fois environ 0gr,4 de la même manière et avec la même précision que pour l'oxalate, puis on opéra l'étalonnage de l'acide tout à fait comme il a été décrit plus haut. Il s'ensuit que l'exactitude de chaque essai doit être à peu près égale à celle indiquée précédemment pour un étalonnage au moyen de l'oxalate, supposé toutefois que la substance en elle-même n'amène pas de sources d'erreur.

Immédiatement après le pesage des échantillons destinés à l'étalonnage de l'acide, on pesa 1 à 2 gr. pour la détermination de la teneur en hydroxyde de sodium et environ 4 gr. pour celle

de l'eau; cependant, n'ayant pas été fixés lors de nos premiers essais sur la valeur de cette dernière, nous ne l'avons introduite que plus tard.

La recherche de l'hydroxyde de sodium fut effectuée de la manière suivante:

Dans une fiole conique remplie d'air pur et débarrassé d'acide carbonique, on plaça 1 ou 2 gr. du carbonate, qu'on fit dissoudre dans 100 cc. d'eau bouillie additionnée de phénolphtaléine et qu'on avait au prealable fait bouillir, puis refroidir dans un courant d'air privé d'acide carbonique. Le sel ayant été dissous, on ajouta dans le premier cas (1 gr. de carbonate) 6 gr. de chlorure de baryum pur et cristallisé, et dans le second cas (2 gr. de carbonate) $8^{gr},3$ de ce même chlorure. Il se forma ainsi une liqueur rouge, laquelle, après l'avoir bien agitée — toujours à l'abri de l'acide carbonique de l'atmosphère —, on titra avec de l'acide chlorhydrique normal au $^1/_{10}$ jusqu'à disparition de la couleur rouge. Comme la différence entre un équivalent de carbonate sodique (53,05) et un équivalent d'hydroxyde de sodium (40,06) est d'environ 13, il s'ensuit que 1 cc. d'acide chlorhydrique normal au $^1/_{10}$ correspond à une perte de poids de $1^{mgr},3$ dans la transformation du carbonate en hydroxyde; la formation d'oxyde sodique aurait pour conséquence que 1 cc. d'acide chlorhydrique normal au $^1/_{10}$ répondrait à une perte de $2^{mgr},2$. Nous avons toujours compté avec la formation d'hydroxyde, et dans cette supposition 1 cc. d'acide chlorhydrique normal au $^1/_{10}$ correspond donc à une perte de poids de 0,13 % quand on avait employé 1 gr. à l'épreuve, et a 0,065 % dans le cas de 2 gr. Ce n'est que dans les premiers essais que nous nous sommes contentés de 1 gr.; plus tard nous avons toujours fait porter l'épreuve à 2 gr., et dans les tableaux qui suivent, nous avons partout inscrit les chiffres correspondant à 2 gr. de carbonate.

Les essais suivants nous ont donné la preuve de la sûreté de ce procédé[1]):

Nous préparâmes du carbonate de baryum pur en précipitant du chlorure de baryum au moyen de carbonate de sodium, puis débarrassant le précipité de son chlore en lavant à l'eau bouillie et encore chaude. Le carbonate barytique ainsi obtenu servit

[1]) Comparez aussi la belle recherche de F. W. Küster dans la Zeitschr. für anorg. Chemie, **13**, 127 (1896).

pour les essais suivants, par doses de $0^{gr},5$ chaque fois. On employa pour chaque essai 100 cc. d'eau bouillie et 5 gouttes de solution de phénolphtaléine; après addition des sels nommés à propos de chaque essai, on porta à l'ébullition, fit refroidir à nouveau dans de l'eau, et enfin procéda au titrage, tout en continuant à faire passer de l'air exempt d'acide carbonique.

1^0 6 gr. de chlorure de baryum. — La liqueur, qui était incolore au début, acquit une coloration nettement rouge par addition d'une goutte de lessive de soude normale au $^1/_{10}$.

2^0 $^1/_2$ gr. de carbonate de baryum. — La liqueur, primitivement d'un rouge intense, se décolora par $0^{cc},6$ d'acide chlorhydrique normal au $^1/_{10}$; le virage n'était guère bien accusé.

3^0 $^1/_2$ gr. de carbonate de baryum + $0^{gr},7$ de chlorure de baryum. — A chaud, la liqueur était rouge; par refroidissement elle devint incolore, puis additionnée d'une goutte de lessive de soude elle reprit la couleur rouge avec une intensité beaucoup moindre. Virage mieux accusé qu'en 2^0.

4^0 $^1/_2$ gr. de carbonate de baryum + $3^{gr},7$ de chlorure de baryum (quantité égale à l'excès de chlorure de baryum lors des essais portant sur 1 ou 2 gr. de carbonate sodique, doses correspondant respectivement à $2^{gr},3$ et à $4^{gr},6$ de chlorure barytique). — La liqueur était incolore même à chaud; additionnée d'une goutte de lessive de soude, elle prit une teinte faiblement rouge, et le virage était bien accusé.

5^0 $1^{gr};1$ de chlorure de sodium correspondant à 1 gr. de carbonate de sodium. — La liqueur, d'incolore qu'elle était, devint rouge par addition d'une goutte de lessive de soude.

6^0 $1^{gr},1$ de chlorure de sodium + $^1/_2$ gr. de carbonate de baryum. — La liqueur fortement rouge se décolora à peine par $0^{cc},92$ d'acide chlorhydrique normal au $^1/_{10}$, et le virage était peu accusé.

7^0 $1^{gr},1$ de chlorure de sodium + $3^{gr},7$ de chlorure de baryum + $^1/_2$ gr. de carbonate de baryum. — La liqueur était d'un rouge faible, qui disparut par addition d'une goutte d'acide chlorhydrique normal au $^1/_{10}$.

Ces essais montrent qu'une solution aqueuse de carbonate de baryum a sur la phénolphtaléine une réaction nettement alcaline; mais cette réaction se trouve complètement réprimée par addition de chlorure de baryum. Comme il fallait s'y attendre, le chlorure de sodium

augmente la réaction alcaline du carbonate barytique; toutefois, dans ce cas aussi, une addition de chlorure barytique ramène la réaction neutre.

Enfin nous fîmes trois essais en vue de prouver que la réaction alcaline que nous trouvions constamment dans l'examen du carbonate sodique desséché, était bien due à ce sel et devait, par conséquent, être proportionnelle à la quantité mise en œuvre. Le dispositif expérimental était le même qu'à l'ordinaire; le carbonate examiné était séché dans l'étuve électrique à 285°.

8° 1 gr. de carbonate de sodium + 6 gr. de chlorure de baryum. — Coloration fortement rouge; il a fallu 0cc,66 d'acide chlorhydrique normal au 1/10.

9° 1 gr. de carbonate de sodium + 6 gr. de chlorure de baryum + 2gr,2 de chlorure de sodium (répondant à 2 gr. de carbonate de sodium). — Coloration fortement rouge; il a fallu 0cc,60 d'acide chlorhydrique normal au 1/10.

10° 3 gr. de carbonate de sodium + 10gr,6 de chlorure de baryum (donc ici, comme en 8° et 9°, un excès de 3gr,7 de chlorure de baryum et, de même qu'en 9°, 3gr,3 de chlorure de sodium provenant des 3 gr. de carbonate de sodium). — Un rouge très intense; il a fallu 2cc,1 d'acide chlorhydrique normal au 1/10, donc 0cc,7 par gramme de carbonate sodique.

On voit en résumé que la consommation d'acide ne dépend que de la quantité de carbonate sodique mise en œuvre. La différence de concentration en chlorure sodique en 8° et en 9° ne donne lieu à aucune divergence.

Le dosage d'eau fut exécuté de la façon suivante:

Environ 4 gr. de carbonate de sodium furent pesés aussi rapidement que possible avec la précision de 0gr,1 environ dans une grande nacelle de platine, qu'on plaça ensuite dans un tube à combustion. On chauffa le carbonate sodique jusqu'à ce qu'il commença a suinter, tout en faisant passer lentement à travers le tube 1 l., en tout, d'air pur et bien sec. L'eau ainsi chassée fut recueillie dans un petit tube chargé de chlorure de calcium. Celui-ci fut pesé aussi soigneusement que possible, et toujours avec un tube pareil comme tare. Immédiatement avant l'essai principal, on fit un essai à blanc exactement de la même manière[1]),

[1]) Préalablement le tube était porté au rouge en le faisant traverser par de l'air bien sec, de manière que, avant l'exécution de cet essai à blanc, le tube fût dans le même état qu'avant l'essai principal.

et l'augmentation de poids ainsi subie par le tube à chlorure de calcium (de 1 mgr. à $1^{mgr},5$) fut retranchée de l'essai principal. Quand la proportion d'eau ainsi trouvée dans les 4 gr. de carbonate sodique s'est montrée inférieure a 1 mgr., nous avons tenu le sel pour anhydre; c'est pourquoi nous n'avons pas tenu compte d'une teneur en eau inférieure à $^1/_{4000}$.

B. Les essais effectués.

La lessive de soude employée était de concentration telle que 100 cc. répondaient à $103^{cc},17$ de l'acide chlorhydrique.

a. Etalonnage au moyen d'oxalate de sodium.

La première série d'essais fut exécutée avant, la seconde après les étalonnages, décrits plus loin, à l'aide du carbonate de sodium. Ainsi qu'on le verra par la dernière colonne du tableau I, le chauffage de l'oxalate sodique dans ces deux séries d'essais se fit de manières tout à fait différentes. Dans la troisième et la quatrième série le sel fut chauffé exactement de la manière indiquée par Lunge[1]); dans la troisième série on fit usage de l'alcool comme source de chaleur, et dans la quatrième, de gaz d'éclairage ordinaire. Les résultats sont rassemblés dans le tableau I.

Il ressort de ce tableau que le résultat est toujours le même, quelle que soit la façon dont on opère la décomposition de l'oxalate, même si l'on emploie le procédé de chauffage indiqué par Lunge; seulement il est nécessaire d'user d'alcool comme source de chaleur, car le gaz, renfermant du soufre, peut occasionner une formation de sulfite et de sulfate sodiques, ce qui aurait pour effet que l'acide paraîtrait trop fort. Comme Lunge n'indique pas la source de chaleur qu'il emploie, il est vraisemblable qu'il se sert de gaz d'éclairage, et ainsi il est tout naturel qu'avec l'oxalate il trouve le coefficient d'acide d'environ $^1/_{1000}$ plus grand que dans le cas du carbonate; dans notre 4e série nous avons même rencontré une augmentation légèrement plus grande (de $^1/_{760}$ environ). On n'eut pas de peine à démontrer qu'il y avait bien eu formation de sulfite et de sulfate; car après décomposition comme dans la quatrième série, puis dissolution dans l'acide chlorhydrique, $^1/_2$ gr. d'oxalate de sodium émit une

[1]) Zeitschr. für angew. Chemie, **17**, 230 (1904).

Tableau I.

Série d'essais	Oxalate sodique mis en œuvre	Acide mis en œuvre	Hydroxyde de sodium	Température	Quantité d'acide (mesurée à 0° correspondant à la quantité pesée d'oxalate sodique	Coefficient d'acide = Concentration de l'acide $c \times {}^{n}/_{10}$	Mode de décomposition de l'oxalate de sodium
	gr	cc.	cc.	Degrés centigr.	cc.	c.	
Première.	0,5318	80,74	0,67	20,5	80,04	0,99093	Décomposition lente (1 heure $^{1}/_{2}$). Tout le charbon a été brûlé sans que le carbonate soit entré en fusion.
	0,5714	86,47	0,40	21	86,04	0,99048	Décomposition plus rapide (1 h.). Une partie du carbonate sodique avait fondu.
	0,4329	65,81	0,60	22,5	65,16	0,99085	Durée de la chauffe 1 heure. La totalité du carbonate sodique avait fondu.
	0,4849	73,57	0,50	20	73,05	0,98998	Chauffage très rapide: durée totale 25 minutes. Tout le charbon avait été brûlé, et le carbonate avait fondu entièrement.
				Moyenne...		0,99056	
Deuxième.	0,4675	70,79	0,40	19	70,39	0,99054	Décomposition lente (2 h.). Le carbonate avait fondu entièrement.
	0,5635	85,33	0,48	19	84,85	0,99048	Décomposition rapide ($^{3}/_{4}$ h.). Beaucoup de charbon; brûlé en totalité. Fusion totale du carbonate.
	0,4797	72,54	0,30	19	72,24	0,99035	Décomposition très lente (3 h.). Peu de charbon, qui a été brûlé sans que le carbonate ait fondu.
	0,3753	56,80	0,28	20	56,51	0,99050	Décomposition très rapide ($^{1}/_{2}$ h.). Beaucoup de charbon, qui a été brûlé entièrement. Fusion totale du carbonate.
	0,5597	84,71	0,40	21	84,28	0,99048	Décomposition rapide ($^{3}/_{4}$ h.). Beaucoup de charbon, qui a été brûlé en majeure partie. La totalité du carbonate était restée infusible.
				Moyenne....		0,99047	
Troisième.	0,5783	87,50	0,39	21	87,08	0,99045	Chauffage d'après Lunge, en employant de l'alcool comme source de chaleur.
	0,4458	67,46	0,29	22,5	67,13	0,99043	
	0,4933	74,67	0,38	21	74,27	0,99060	
				Moyenne....		0,99049	
Quatrième.	0,5021	76,05	0,53	22,5	75,46	0,99236	Chauffage d'après Lunge, en employant du gaz d'éclairage.
	0,5605	84,56	0,15	24	84,34	0,99118	
	0,4806	72,77	0,48	20	72,27	0,99180	
	0,4481	67,65	0,21	21	67,42	0,99124	
	0,4184	63,16	0,24	22,5	62,88	0,99238	
				Moyenne....		0,99179	

odeur marquée d'acide sulfureux, et une addition de chlorure de baryum détermina une précipitation appréciable de sulfate de baryum. Il va de soi qu'il se produit le plus de sulfite et de sulfate lors d'une chauffe particulièrement forte et prolongée, puisque surtout le creuset chaud est facilement pénétrable aux produits de combustion du gaz.

Au moyen d'un faible chauffage sur une flamme de gaz, $0^{gr},4574$ d'oxalate fut décomposé en une heure sans que le carbonate fondît; ensuite les charbons furent éliminés par fusion du carbonate en cinq minutes; la titration exigea $69^{cc},17$ d'acide chlorhydrique et $0^{cc},30$ de lessive de soude mesurés à 22^0; donc le coefficient était de 0,99110.

$0^{gr},4641$ d'oxalate, après décomposition comme précédemment, fut maintenu en fusion pendant 2 heures sur une flamme de gaz; la titration exigea $70^{cc},07$ d'acide chlorhydrique et $0^{cc},40$ de lessive de soude, mesurés à 22^0; le coefficient dans ce cas-ci était de 0,99405.

Il n'y a pas de perte de sodium par suite de cettechauffe prolongée du carbonate; car un chauffage sur une flamme d'alcool pendant le même espace de temps n'entraîne pas d'augmentation du coefficient d'acide.

$0^{gr},4704$ d'oxalate fut décomposé par chauffage pendant une heure sur une lampe à alcool sans que le carbonate fondît; ensuite on maintint ce dernier en fusion pendant 2 heures. La titration exigea $71^{cc},20$ d'acide chlorhydrique et $0^{cc},33$ de lessive de soude, mesurés à 22^0. Le coefficient fut donc trouvé égal à 0,99050, soit exactement la même valeur que celle trouvée dans nos trois premières séries.

La moyenne des quotients d'acide de ces treize déterminations opérées par chauffage à l'alcool, est de 0,99051; comme l'oxalate sodique utilisé a une teneur en eau hygroscopique de $^1/_{12000}$ (voir p. 142), le coefficient de l'acide chlorhydrique trouvé au moyen de cet oxalate sera de

$$0.9904(3).$$

b. Etalonnage au moyen de carbonate de sodium.

Ainsi qu'on le verra dans le tableau II, première colonne, on se servit pour cet étalonnage de différents échantillons de carbonate de sodium ayant des teneurs en eau différentes. Ces échantillons, qui avaient été à plusieurs reprises recristallisés dans de l'eau, ne renfermaient ni chlorure ni sulfate, et l'épreuve à la phénolphtaléine et au chlorure de baryum n'y fit jamais déceler d'hydroxyde de sodium, mais bien, le plus souvent, une légère teneur en bicarbonate. Le chauffage fut effectué d'après

Tableau II.

Quantité, sorte et mode de chauffage du carbonate de sodium. Les températures indiquées ont toutes été mesurées dans la soude	Quantité de carbonate utilisée pour l'étalonnage	Acide mis en œuvre	Hydroxyde de sodium	Température	Quantité d'acide (mesurée à 20°) correspondant à la quantité pesée de carbonate	Coefficient d'acide
	gr.	cc.	cc.	Degrés centigr.	cc.	c.
Série expérimentale A.						
10 gr. de soude déshydratée à 90° étaient chauffés dans un creuset en platine au bain de sable sur une flamme de gaz. Dans le courant de 20 minutes la température montait à 270°; ensuite on la maintenait pendant une demi-heure entre 270° et 280°. Pendant le chauffage, on remuait la soude à plusieurs reprises. La soude chauffée était exempte d'acide sulfurique.	0,3826	73,22	0,35	22,5	72,82	0,99038
	0,4179	79,91	0,24	22	79,63	0,98924
	0,2864	55,00	0,51	22	54,45	0,99148
	0,4525	86,38	0,25	22,5	86,08	0,99090
				Moyenne..		0,99050
Série expérimentale B.						
10 gr. de soude renfermant env. 15 % d'eau étaient chauffés tout à fait de la même manière que dans la série **A**.	0,3640	69,73	0,38	21	69,33	0,98968
	0,4142	79,26	0,35	22	78,87	0,98994
	0,4330	82,72	0,22	20	82,49	0,98946
				Moyenne..		0,98969
Série expérimentale C.						
15 gr. de soude renfermant env. 28 % d'eau étaient traités comme dans la série **A**; toutefois la température était maintenue un peu plus élevée (285° à 310° au lieu de 270° à 280°), et la soude était remuée continuellement pendant toute la durée de la chauffe.	0,4130	78,86	0,25	20	78,60	0,99048
	0,3557	67,97	0,27	20	67,69	0,99054
	0,3021	57,69	0,19	20	57,49	0,99054
				Moyenne..		0,99052
Série expérimentale D.						
12 gr. de soude renfermant 14,5 % d'eau étaient chauffés dans un creuset de platine au bain de sable pendant 25 minutes jusqu'à 340°, température qu'on maintenait ensuite durant une demi-heure. Cette température élevée était produite par deux grandes flammes de gaz. La soude chauffée contenait un peu d'acide sulfurique. On remuait comme dans **C**.	0,4009	76,78	0,44	20	76,33	0,99003
	0,3515	67,23	0,35	20	66,87	0,99085
	0,3064	58,49	0,22	20	58,26	0,99135
				Moyenne..		0,99074
Série expérimentale E.						
12 gr. de soude renfermant 14,5 % d'eau étaient chauffés sur une lampe à gaz Argand si fortement, que la température de la soude dépassait 360° durant une demi-heure; cependant la soude n'avait pas fondu et le creuset n'avait pas atteint le rouge visible. La soude chauffée contenait un peu d'acide sulfurique. On remuait comme en **C**.	0,4010	76,72	0,38	20	76,33	0,99026
	0,3437	65,77	0,34	20	65,42	0,99033
	0,3249	62,18	0,35	20	61,82	0,99068
				Moyenne..		0,99042
Série expérimentale F.						
13 gr. de soude renfermant 14,5 % d'eau étaient chauffés sur une lampe à esprit de vin Berzelius (comme lors d'une décomposition d'oxalate). En 10 minutes, on atteignait 360°, température qu'on maintenait pendant une demi-heure. La soude était naturellement restée exempte d'acide sulfurique. On remuait comme en **C**.	0,4192	80,81	1,00	19	79,80	0,99022
	0,3507	66,99	0,17	19	66,82	0,98933
	0,3305	63,17	0,21	19	62,96	0,98950
				Moyenne..		0,98968
Série expérimentale G.						
15 gr. de soude renfermant 14,5 % d'eau étaient traités comme dans la série **F**. à ceci près qu'on maintenait la température un peu plus basse (300°).	0,4256	81,46	0,40	22	81,02	0,99020
	0,3131	60,16	0,50	23	59,60	0,99024
	0,3485	66,70	0,32	21	66,36	0,98992
				Moyenne..		0,99012

Lunge; toutefois, comme le montre la première colonne du tableau II, on le modifia de diverses façons dans les limites indiquées par Lunge; comme source de chaleur on employa le gaz et l'alcool.

Tableau III.

Série expérimentale (Voir Tableau II)	Quantité d'acide chlorhydrique norm. au $^1/_{10}$ exigée par 2 gr. de soude dans la détermination de la perte d'acide carbonique cc.	Cette perte d'acide carbonique correspond à une perte de poids de %	Teneur en eau de la soude chauffée %	Coefficient d'acide « C_5 trouvé (voir tableau II) C.	« C_5 corrigé pour la perte d'acide carbonique de la soude	« C_5 corrigé pour la perte d'acide carbonique et la teneur en eau de la soude
A.	0,40	0,03	Pas déterminée	0,99050	0,99080	0,99080?
B.	1,04	0,07	Pas déterminée	0,98969	0,99038	0,99038?
C.	0,50	0,03	0,04	0,99052	0,99082	0,99042
D.	0,65	0,04	0,04	0,99074	0,99114	0,99074
E.	0,82	0,05	Nulle	0,99042	0,99092	0,99092
F.	0,62	0,04	Nulle	0,98968	0,99008	0,99008
G.	0,58	0,04	Nulle	0,99012	0,99052	0,99052
	Moyenne de toutes les séries . . .			0,9902(4	0,9906(7)	0,9905 5

Les tableaux II et III feront voir que les étalonnages au moyen du carbonate de sodium ont donné à peu près le même résultat que celui fourni par l'oxalate. Cependant les chiffres réunis au tableau III montrent que les coefficients d'acide directement trouvés (colonne 5) sont, en moyenne, un peu plus bas (0,9902[4]) que dans l'étalonnage à l'oxalate (0,9904 3), et que cette moyenne devrait sûrement être encore un peu plus basse que 0,9902(4), attendu que, dans les séries D et E, la soude après chauffage laissait voir un peu d'acide sulfurique (voir tableau II, colonne 1), et que, par conséquent, le coefficient d'acide a été trouvé un peu trop élevé dans ces séries. Bien que la différence entre le résultat obtenu au moyen de la soude et celui fourni par l'oxalate, soit très faible et n'atteigne point la grandeur trouvée par Lunge (voir p. 141), il nous a semblé intéressant d'en rechercher la cause, que nous croyons avoir trouvée dans

la perte d'acide carbonique à laquelle donne lieu le chauffage du carbonate sodique. Dans la deuxième colonne du tableau III nous avons donné la quantité d'acide chlorhydrique normal au $^1/_{10}$ exigée dans l'épreuve précédemment décrite (voir p. 146) pour neutraliser l'hydroxyde de sodium dans 2 gr. de la soude chauffée; la 3e colonne indique la perte équivalente en poids, et dans la 6e colonne on trouve le coefficient d'acide corrigé relativement à cette perte. On peut voir que ce dernier est d'autant plus élevé que le coefficient non corrigé est plus bas que celui trouvé au moyen de l'oxalate de sodium. Cela tient à ce qu'il reste encore un peu d'eau en C et D du moins, si pas aussi en A et B (voir tableau III, 4e colonne); en faisant une correction relative à cette eau aussi, on arrive aux valeurs énumérées dans la dernière colonne. La moyenne de celles-ci (0,9905[5]) ne dépasse que de très peu la moyenne des chiffres obtenus par l'étalonnage de l'oxalate de sodium (0,9904[3]), et comme nous l'avons déjà vu, elle est sans aucun doute un peu trop élevée, puisque D et E contiennent des traces d'acide sulfurique et que A et B renferment peut-être une trace d'eau.

En nous basant sur ces faits, nous croyons pouvoir établir que l'étalonnage d'un acide donne à peu près le même résultat, qu'il soit effectué à l'aide du carbonate ou de l'oxalate de soude; le fait que la soude donne ordinairement un coefficient légèrement inférieur à celui obtenu au moyen de l'oxalate, tient à ce que celle-là perd par suite de la chauffe un peu plus d'acide carbonique qu'elle ne retient d'eau. Dans tous les travaux ordinaires il est, par conséquent, tout à fait indifférent de se servir, pour l'étalonnage, d'oxalate sodique ou de soude séchée suivant le procédé de Lunge; car l'un et l'autre peuvent être regardés comme des étalons irréprehensibles.

Lorsqu'il s'agit de travaux d'une exactitude absolue, nous conseillerons de sécher la soude à environ 360°, en remuant bien, dans un creuset en platine sur une lampe Berzelius, munie d'une cheminée d'Argand en terre glaise; en même temps qu'on fait l'étalonnage de l'acide, il faut alors déterminer la perte d'acide carbonique.

De cette manière on peut avoir l'assurance 1° qu'il ne se forme pas de sulfate, 2° que toute l'eau est expulsée, et 3° qu'on peut déterminer très exactement la correction nécessitée par la perte d'acide carbonique. Dans ce genre de travaux rigoureux

l'oxalate sodique offre sur la soude le grand avantage qu'une portion importante peut être examinée une fois pour toutes au point de vue des impuretés; de plus, l'oxalate peut se conserver sans altération pendant des années entières, alors que la perte d'acide carbonique de la soude doit être déterminée après chaque chauffage.

Nous devons encore ajouter que nous avons également essayé de déshydrater le carbonate de sodium dans une étuve chauffée électriquement. La soude ne fut pas remuée pendant le chauffage et — surtout lorsqu'elle formait une couche un peu épaisse — demanda beaucoup plus de temps qu'il n'en faut lors du chauffage direct avec des agitations continuelles. Nous pûmes constater qu'il se formait aussi dans l'étuve électrique de l'hydroxyde sodique.

Comme exemples nous citerons ce qui suit:

1° On chauffa lentement 10 gr. de soude vers 285° dans le courant de $5^{h}.1/2$; par là son poids diminua de 17,34 %. La perte d'acide carbonique déterminée et calculée de la manière habituelle, fut de 0,08 %.

2° Environ 2 gr. de la même soude, placés dans l'étuve préalablement chauffée vers 270° à 280°, furent maintenus pendant 2 heures à cette température. La perte de poids fut de 17,46 %, la perte d'acide carbonique de 0,03 %.

Dans les deux échantillons chauffés on put encore déceler avec certitude une trace d'eau.

Desséché à 100° à 120°, même le bicarbonate de sodium forme de l'hydroxyde sodique avant d'être déshydraté totalement, ce que nous démontrerons par l'exemple suivant:

3° Environ 6 gr. de bicarbonate sodique subirent en 8 heures à 100° à 120° une perte de 36,93 % (calculée pour 1 molécule d'eau et 1 molécule d'acide carbonique: 36,89 %). Toute trace de l'acide carbonique du bicarbonate avait disparu, et en outre il s'était formé de l'hydroxyde de sodium, car lors de la titration effectuée par le procédé ordinaire (voir p. 146) 2 gr. de soude exigèrent 0^{cc},66 d'acide chlorhydrique normal au $\frac{1}{10}$. Une trace sensible d'eau se laissait encore remarquer.

C. Sur la phénolphtaléine et le méthylorange.

Comme il a déja été dit, nous avons dans le présent travail employé la phenolphtaleine comme indicateur, parce que c'est un reactif beaucoup plus precis que le méthylorange Le virage de la phenolphtaleine d'incolore au rouge faible est provoqué par une goutte de lessive normale au $^1/_{10}$ de soude, tandis que le methylorange demande au moins deux gouttes d'acide normal au $^1/_{10}$ pour que le passage du jaune au rouge orange soit perceptible à un œil exercé lorsque la liqueur est en quantité de 100 à 200 cc.

Lunge voit le principal avantage du méthylorange dans ce fait que, contrairement a la phenolphtaleine, il reste insensible a l'action de l'acide carbonique. Cette assertion peut être juste lorsqu'il s'agit d'analyses ordinaires, mais elle n'est plus admissible quand il est question d'analyses vraiment minutieuses; ceci résulte déjà du travail de F. W. Küster[1]).

Les indications de ce chimiste se trouvent confirmées par quelques essais que nous avons effectués. Dans ceux-ci nous avons mis en œuvre: 1° de l'acide chlorhydrique normal au $^1/_{10}$; 2° une solution un peu plus forte d'hydroxyde de sodium, 3° la solution de phénolphtaleine mentionnée plus haut, 4° une solution de méthylorange $0^{gr}{,}05$ dans 100 cc. d'eau [2], de laquelle nous avons employé 3 gouttes pour chaque essai; enfin, pour déterminer la *couleur normale* d'apres Küster[3]), 5° une solution de 3 gouttes de la solution de méthylorange dans 150 cc. d'eau saturée d'acide carbonique.

Voici comment nous avons opéré: A 60 à 70 cc. de lessive de soude renfermés dans une fiole conique, on laissa tomber goutte a goutte de la solution de phénolphtaléine, puis un léger excès d'acide. Complétée avec de l'eau jusque vers 200 cc., la liqueur fut réduite a 150 cc. dans un courant d'air exempt d'acide carbonique, puis refroidie à l'eau froide. Finalement,

a° on titra au moyen de la lessive de soude jusqu'à coloration faiblement rose; puis, après lecture de la burette,

b° on décolora avec une goutte d'acide. On lut de nouveau la burette, et apres addition de 3 gouttes de solution de méthylorange on continua la titration; à cet effet

[1]) Zeitschr. für anorg. Chemie. **13**, p. 127—150 (1896).

[2]) Fr. Glaser: Indikatoren der Azidimetrie und Alkalimetrie (1901), p. 49.

[3]) A l'endroit cité, p. 141.

c⁰ on ajouta de l'acide jusqu'à ce que la liqueur jaune fût devenue nettement rouge, après quoi on lut encore la burette. Ceci fait, on satura d'acide carbonique le contenu de la fiole, ce qui fit passer la couleur au rouge marqué; on versa alors de la lessive de soude jusqu'à ce que la liqueur redevint jaune; enfin

d⁰ on titra avec de l'acide jusqu'à coloration rougeâtre et, après lecture de la burette,

e⁰ jusqu'à la couleur dite *normale*.

Les résultats ont été réunis dans le tableau IV. Les chiffres indiquent le nombre de centimètres cubes d'acide répondant dans les conditions exposées ci-dessus à 100 cc. de lessive de soude.

Tableau IV.

N° de l'essai	Liqueur exempte d'acide carbonique			Liqueur saturée d'acide carbonique	
	Phénolphtaléine Rose	Phénolphtaléine Incolore	Méthylorange Nettement rouge	Méthylorange Rougeâtre	Méthylorange *Couleur normale*
1	106,12	106,21	106,81	105,94	106,41
2	106,01	106,10	106,96	105,84	106,24
3	106,05	106,14	106,95	105,80	106,35
Moyenne	106,06	106,15	106,91	105,86	106,33

Ce tableau montre que 100 cc. de lessive de soude exigent pour être neutralisés environ 106cc,1 d'acide chlorhydrique, car le vrai point de neutralisation coïncide presque exactement avec celui trouvé au moyen de la phénolphtaléine[1]).

Une telle liqueur réellement neutre (100 cc. de lessive de soude et 106cc,1 d'acide chlorhydrique) se colore d'un jaune pur par le méthylorange, et il faut une assez forte dose d'acide pour provoquer un changement de la couleur. Si, au contraire, on fait passer de l'acide carbonique dans un liquide neutre coloré en jaune par le méthylorange, la couleur ne tardera pas à changer, et quand le liquide est saturé d'acide carbonique, il faut y ajouter de la lessive de soude pour provoquer la couleur de virage. Pour atteindre le point où le liquide devient neutre vis-à-vis du méthylorange, il faut donc plus ou moins d'acide qu'il

[1]) Comparez F. W. Küster et Max Grüters: Zeitschr. für anorg. Chemie **35**, pp. 454—459 (1903).

n'en faut pour une neutralisation réelle: plus si le liquide est exempt d'acide carbonique, moins s'il en est très riche, et comme on le verra par le tableau IV, il s'agit de doses d'acide d'une grandeur telle qu'on ne peut en faire abstraction lors des analyses exactes.

Il est vrai qu'entre ces extrêmes (c'est-à-dire, d'un côté, un liquide exempt d'acide carbonique et exigeant trop d'acide et, de l'autre, un liquide saturé d'acide carbonique et demandant trop peu d'acide) il existe une concentration convenable d'acide carbonique, concentration où la consommation d'acide est exactement celle qu'exige la neutralisation vis-à-vis de la phénolphtaléine; mais en pratique, il n'est naturellement pas possible que cette concentration puisse toujours se rencontrer. Et de même aussi dans le choix de la teinte finale du titrage, il y a de l'incertitude (rougeâtre à rouge net), et nous ne pouvons pas comprendre comment il pourrait être possible d'être toujours sûr de finir par la même teinte, si ce n'est en titrant en liqueur saturée d'acide carbonique et comparant avec la liqueur de comparaisson proposée par Küster et présentant la *couleur normale*.

Cette sensibilité du méthylorange vis-à-vis de l'acide carbonique ressort encore très nettement des essais de Lunge, sans que cependant il semble s'en être aperçu. Dans quelques essais présentés au *Congrès international de chimie appliquée* à Berlin 1903[1] et qui ont plus tard été reproduits sans modification aucune dans son mémoire déja cité plusieurs fois[2]), Lunge a trouvé qu'un étalonnage d'une lessive de soude avec de l'acide chlorhydrique normal au $^1/_5$, donne à peu près le même chiffre pour le titre de cette lessive, soit qu'on se serve de phénolphtaléine ou de méthylorange comme indicateur, pourvu qu'à l'étalonnage à la phénolphtaléine l'acide carbonique soit complètement chassé par ébullition. En contradiction apparente avec ce résultat se trouvent d'autres essais faits par Lunge après le congres et qui, dans sa communication dans la «Zeitschrift für angewandte Chemie» font suite à ceux dont il a été question ci-dessus. Lunge trouve maintenant que

«der Neutralisationspunkt bei Anwendung verschiedener Indikatoren verschieden ausfällt, dass man also eine für einen

[1]) V. internationaler Kongress für angewandte Chemie, Berlin 1903. Bericht IV, p. 967.

[2]) Zeitschr. für angewandte Chemie, **17**, p. 200 (1904).

Indikator eingestellte Normallösung nicht ohne weiteres mit einem anderen Indikator verwenden darf»[1].

Comme preuve de cette affirmation il cite deux séries d'essais[2]):

«Eine in bekannter Weise hergestellte und vor Anziehung von Kohlensäure geschützte Barytlösung, die in die Bürette von unten eintrat, wurde mit einer auf Soda gestellten $^1/_5$-n. Salzsäure verglichen. Bei Anwendung von Methylorange und Titrierung bis zur braunen Uebergangsfarbe wurde auf je 40 cc. der Säure an Barytlösung verbraucht: 32,54—32,52—32,53, wonach man den Koefficienten 1,2324 anvenden muss, um die Barytlösung auf $^1/_5$-n. umzurechnen. Bei Anwendung von Phenolphtalein und Titrierung bis zu dem Punkte, wo eben die schwächste Rosafärbung auftritt, brauchten je 40 cc. Säure: 32,70—32,64—32,68 cc. Barytlösung, deren Koefficient hiernach 1,2270 ist. Das ist denn doch ein ganz erheblicher Unterschied, nämlich 0,57 %.

Dieselbe Vergleichung wurde auch mit wasserfreier Soda angestellt (Bei 280°—300° getrocknet). In 6 Versuchen fand sich ein mittlerer Koefficient der $^1/_5$-n. Säure für Methylorange (auf braun) = 1,0301 mit Abweichungen von $\pm$ 0,07 %, für Phenolphtalein aber 1,0276, also auch wieder eine Abweichung von 0,35 % in den Koefficienten, je nach dem angewendeten Indikator»[3]).

Lunge n'a pas remarqué que les écarts constatés dans ses deux séries expérimentales sont de signe opposé. Lors de l'étalonnage de la solution de baryte, l'acide carbonique n'entre pas

---

[1]) Souligné par Lunge.

[2]) Zeitschr. für angew. Chemie, **17**, p. 201 (1904).

[3]) Dans ces résultats numériques, comme d'une façon générale dans les parties du mémoire de Lunge que nous avons considérées, il y a malheurensement quelques fautes typographiques, et des chiffres il y en a si peu qu'une vérification est souvent impossible. Dans la comparaison ci-dessus mentionnée entre une solution barytique et l'acide chlorhydrique, ce dernier ne peut pas avoir été exactement normal au $^1/_5$; mais si l'on admet qu'il ait été normal au $^1/_5 \times 1{,}0022$, on arrive aux coefficients donnés par Lunge: 1,2324 (méthylorange) et 1,2270 (phénolphtaléine). La différence entre ces coefficients est de 0,0054, ce qui ne fait pas 0,57 %, comme le dit Lunge, mais seulement 0,44 %. De même, lors des étalonnages d'acides — mentionnés plus haut — à l'aide de la soude, Lunge a trouvé le coefficient de l'acide en présence du méthylorange = 1,0301, et avec la phénolphtaléine = 1,0276. La différence ici est de 0,0025 ou 0,24 %, et non pas, comme il l'indique, 0,35 %.

On voit aisément que ces rectifications n'ont pas d'influence ultérieure sur le résultat principal des essais.

en jeu, et c'est pourquoi il faut employer plus d'acide avec le methylorange qu'avec la phenolphtaleine, en sorte que dans le cas de cet indicateur-là on trouve la solution barytique trop forte 1,2324 au lieu de 1,2270. On pourrait naturellement aussi prendre la solution barytique comme unité, et dans ce cas les essais montrent que lorsqu'il n'y a pas d'acide carbonique dans la liqueur et que le methylorange sert d'indicateur, on trouve pour l'acide un chiffre trop bas:

$$\left(\frac{1}{1,2324} = 0,8114 \text{ au lieu de } \frac{1}{1,2270} = 0,8150\right).$$

Dans la seconde série d'essais: étalonnage d'un acide au moyen de soude anhydre, c'est l'inverse qui est vrai: ici on est en présence d'une grande quantité d'acide carbonique et, par suite, l'étalonnage avec le methylorange demande trop peu d'acide, ce qui revient à dire que le coefficient d'acide en devient trop élevé 1,0301 au lieu de 1,0276). Les résultats sont donc tout à fait analogues à ceux obtenus dans nos propres essais et consignés dans le tableau IV; en faisant une comparaison, il faut se rappeler que les chiffres donnés dans ce tableau représentent le coefficient de la solution basique.

Ce qui précede nous fait mieux comprendre les essais antérieurs de Lunge, essais dans lesquels il a trouvé avec le méthylorange à peu près les mêmes coefficients qu'avec la phénolphtaléine; car ces essais étaient faits avec de l'acide chlorhydrique et une lessive de soude renfermant une petite proportion de carbonate d'après quelques-uns des titrages donnés par Lunge au moyen de la phénolphtaleine sans élimination de l'acide carbonique, la teneur en carbonate de sodium doit représenter environ 4 % de la teneur totale en sodium), et cette faible quantite d'acide carbonique a donc été suffisante pour augmenter le coefficient d'acide dans le titrage au méthylorange de façon à faire obtenir le même coefficient avec le méthylorange qu'avec la phénolphtaléine.

On voit donc que la proposition soulignée par Lunge lui-même dans la citation ci-dessus et d'après laquelle il n'est pas permis sans autre d'employer une liqueur étalonnée au moyen d'un certain indicateur pour une titration en présence d'un autre indicateur, demande un complément. Du moins lorsqu'il s'agit d'analyses très exactes, on ne peut pas sans autre faire usage d'une solution étalonnée au méthylorange; il

faut toujours avoir bien soin que dans les titrages on soit en présence de la même teneur en acide carbonique que lors de l'étalonnage. La manière la plus simple d'y parvenir nous semble devoir consister à titrer toujours en liqueur saturée d'acide carbonique jusqu'à l'apparition de la *couleur normale* de Küster; par conséquent, avant la titration finale d'une lessive de soude, il faut la saturer d'acide carbonique, et une lessive de baryte ne se prêterait probablement pas du tout à être étalonnée avec exactitude de cette manière. Dans ces conditions il nous semble que les avantages que présenterait le méthylorange sur la phénolphtaléine sont extrêmement douteux lorsqu'il s'agit d'analyses minutieuses.

D. Étalonnage d'un acide normal par pesage du chlorure d'hydrogène ou par dosage gravimétrique de la teneur en chlore.

Dans le mémoire de Lunge il est encore un point à signaler. Après avoir expliqué pourquoi, selon lui, la soude constitue un étalon irrépréhensible pour les acides, Lunge[1]), à l'appui de cette proposition, cite le fait expérimental qu'un acide chlorhydrique qui, étalonné à la soude et en présence du méthylorange, avait donné à des époques différentes les coefficients 1,0301 et 1,0300, fournissait dans deux dosages gravimétriques de chlore à peu près les mêmes coefficients 1,0305 et 1,0296, moyenne 1,03005). Dans le chapitre précédent nous avons cependant à plusieurs reprises fait observer que le méthylorange et la phénolphtaléine montrent des points neutres différents, et que celui qu'on trouve au moyen de la phénolphtaléine est très voisin du point vrai[2]), alors que pour ce qui concerne le point trouvé en présence du méthylorange, il n'en est plus ainsi que dans des conditions bien définies (dépendant de la teneur en acide carbonique de la liqueur à titrer, comme aussi de la couleur de virage choisie). Pour l'acide chlorhydrique, dont il est question ici, Lunge, en employant le méthylorange, a trouvé le coefficient 1,0301, tandis que la phénolphtaléine lui a donné 1,0276 (voir p. 159); on devrait par suite s'attendre à voir le

[1]) A l'endroit cité, p. 232.

[2]) Voir le mémoire déjà cité de F. W. Küster.

dosage de chlore répondre à la vraie teneur en acide telle qu'on la trouve dans le titrage à la phénolphtaléine, et non pas à la valeur, trop élevée de 0,24 ‰, obtenue en titrant à l'aide du méthylorange. Mais, comme on vient de le voir, il n'en est pas ainsi, et ce fait étrange doit probablement pouvoir s'expliquer en admettant que l'acide chlorhydrique a contenu un peu de chlorure. Bien que cette hypothèse doit être regardée comme vraisemblable *a priori*, nous avons cru cependant devoir chercher à éclaircir ce point par des essais.

Tout d'abord, et d'une manière qu'on trouvera exposée dans la suite, nous avons déterminé la teneur en chlore de l'acide ayant servi pour les essais relatés dans le chapitre B. Le coefficient d'acide calculé d'après la teneur en chlore s'est trouvé être de 0,98960, la moyenne des étalonnages à l'oxalate sodique, de 0,99043. Le dosage du chlore donne à Lunge une valeur du titre de l'acide sensiblement plus élevée (1,03005 que celle qu'il a obtenue par l'étalonnage à la soude en présence de la phénolphtaléine (1,0276), tandis que par le dosage du chlore nous trouvons un chiffre un peu trop bas (Lunge trouve la valeur trop élevée de $\frac{1}{420}$; nous la trouvons trop basse de $\frac{1}{1200}$). La légère différence entre nos résultats provient, d'un côté, des erreurs expérimentales et, d'autre part, de ce que dans le dosage du chlore nous avons dosé le chlore avec précision, alors que dans l'étalonnage à l'oxalate de sodium nous avons titré jusqu'à coloration d'un rose faible, c'est-à-dire jusqu'à un léger excès d'hydroxyde de sodium, et l'on voit aisément qu'un excès d'une goutte de la solution d'hydroxyde de sodium signifie une augmentation du coefficient d'acide d'environ $0{,}05 : 80 = \frac{1}{1600}$. Mais en outre, nous avons pu déceler dans notre acide chlorhydrique une faible trace d'acide sulfurique — pas directement il est vrai, mois après évaporation sur une flamme d'alcool), ce qui évidemment est sans conséquence pour les déterminations exposées dans les chapitres précédents, tandis qu'ici, où le titre de l'acide est déterminé d'après sa teneur en chlore, cette trace fait paraître l'acide plus faible qu'il ne l'est en réalité.

En conséquence, afin de pouvoir opérer sur un acide chlorhydrique absolument pur, nous avons entrepris encore un essai, et à cet effet nous avons déterminé le titre de l'acide par un

troisième procédé souvent recommandé[1]), à savoir en pesant la quantité de chlorure d'hydrogène absorbée par une quantité pesée d'eau.

a. Préparation de l'acide chlorhydrique et détermination du titre par pesage du chlorure d'hydrogène absorbé.

Une petite fiole conique (d'environ 150 cc. de capacité) fut fermée avec un bouchon à deux trous, dont l'un était traversé par un petit tube terminé en pointe et qui, descendant à peu près jusqu'au fond de la fiole, était destiné à amener le chlorure d'hydrogène; par l'autre trou passait un petit tube courbé, qui dépassait à peine le bouchon. Après avoir pesé la fiole vide bouchée, on la remplit de 100 cc. d'eau pure, puis la pesa de nouveau. Ensuite on fit arriver du chlorure d'hydrogène, et enfin on effectua le dernier pesage. Lors de tous les pesages, les deux tubes étaient fermés au moyen de tubes en caoutchouc munis de baguettes en verre. Le chlorure d'hydrogène fut développé en faisant tomber de l'acide sulfurique concentré, goutte à goutte, dans de l'acide chlorhydrique également concentré, et on le dessécha à l'aide d'acide sulfurique concentré et de chlorure de calcium. C'est seulement lorsque tout l'air eut été chassé de l'appareil et que le chlorure d'hydrogène fut devenu parfaitement pur, qu'on le fit entrer dans la petite fiole placée dans de l'eau glacée sur le plateau d'un trébuchet. La petite quantité d'air renfermée dans le tube adducteur une fois chassée, l'absorption du chlorure d'hydrogène était complète, et l'on put fermer l'autre tube.

On pouvait surveiller au moyen du trébuchet, à 1 cgr. près, la quantité de chlorure d'hydrogène absorbée. Après avoir fait affluer la quantité voulue de chlorure d'hydrogène, on laissa la fiole au repos jusqu'à ce qu'elle fût revenue à la température ordinaire. Procédant alors au pesage final et exact, on trouva le résultat que voici:

Poids de la fiole vide	43gr,0360
— — — + eau	142gr,7087
— — — — — + HCl..	146gr,3988
Poids du chlorure d'hydrogène..	3gr,6901

[1]) Par exemple par J. Raschig: Zeitschr. für angew. Chemie, **17**, 568 (1904).

Après avoir transvasé le contenu de la fiole dans un ballon exactement jaugé de 1 l. de capacité[1]), on rinça avec de l'eau tant la petite fiole que les deux tubes de verre. Ensuite on versa de l'eau dans le ballon d'un litre à peu près jusqu'au trait, et après l'avoir bien secoué, on le plaça pendant deux heures dans de l'eau de 15°; enfin on le remplit d'eau jusqu'au trait. Nous avions alors un acide chlorhydrique contenant, à 15°, 3gr,6901 de chlorure d'hydrogène par 1000 cc.

Dans l'introduction du présent mémoire (voir p. 143) il a été dit que les burettes employées dans les étalonnages volumétriques sont calibrées avec, comme unité, la boule de 50 cc. de la burette à l'acide, et que toutes les lectures de burettes ont été recalculées à 20°. Afin de pouvoir comparer le titre d'acide indiqué plus haut avec celui trouvé par l'étalonnage à l'oxalate décrit plus loin, du même acide, il est nécessaire de savoir le nombre de centimètres cubes vrais qui correspond à l'unité, arbitrairement choisie, de 50 cc. à 20°.

L'eau contenue dans la boule de la burette à l'acide (18°,5) fut pesée plusieurs fois; on trouva une moyenne de 50gr,078, qui permet de calculer[2]) que le volume réel de la boule à 20° est de 50cc,206 et que, par conséquent,

$$1 \text{ cc. (vrai)} = \frac{50}{50{,}206} \text{ cc. (faux).}$$

De plus[3]):

1000 cc. à 15° = 1000cc,9 à 20° et

1000cc,9 (vrais) = 996cc,8 (faux).

Donc, 996cc,8 (faux, c'est-à-dire les centimètres cubes employés dans les étalonnages titrimétriques) contiennent 3gr,6901 de chlorure d'hydrogène, et l'on aura pour le titre de l'acide:

$$^{n}/_{10} = \frac{1000 \times 3{,}6901}{996{,}8 \times 3{,}6458^{4})} = 1{,}0154 \times {}^{n}/_{10}.$$

b. Étalonnage de l'acide au moyen de l'oxalate de sodium.

Ces étalonnages furent exécutés tout à fait de la même manière que nous avons décrite précédemment (voir p. 142), et

[1]) Ce dernier, à 15°, contenait 998gr,075 d'eau; par conséquent, le volume à la même température était (Landolt et Börnstein: Physik.-chemische Tabellen [1894], p. 42) de 1000cc,01, donc à très peu près 1 litre.

[2]) Landolt et Börnstein: *loc. cit.*

[3]) *Ibid.*, p. 39. [4]) Cl = 35,45, H = 1,008.

Tableau V.

Oxalate sodique pesé	Acide mis en œuvre	Lessive de soude	Température	Quantité d'acide (mesurée à 20°) correspondant à l'oxalate pesé	Coefficient d'acidité C (Normalité de l'acide $= n/_{10} \times C$)	Mode de chauffage de l'oxalate de sodium
gr.	cc.	cc.	Degrés centigr	cc.	C.	
0,5463	80,90	0,69	18,5	80,22	1,01566	Décomposition lente (3 heures). La totalité du charbon avait été brûlée, le carbonate était resté entièrement infusible.
0,4973	73,37	0,40	18	73,00	1,01602	
0,6079	89,65	0,48	17,5	89,22	1,01618	Décomposition plus rapide ($^3/_4$ heures). Totalité du charbon brûlée; fusion totale du carbonate.
0,4973	73,25	0,28	18,5	72,99	1,01615	
				Moyenne	1,0160	

les résultats ont été rassemblés au tableau V. 100 cc. de la lessive de soude utilisée répondaient à 100cc.78 de l'acide chlorhydrique.

Comme l'oxalate sodique employé renfermait $\frac{1}{12000}$ d'eau hygroscopique (voir p. 142), le coefficient d'acide trouvé sera de

1,0159.

c. Étalonnage de l'acide chlorhydrique au moyen d'un dosage gravimétrique de chlore.

Après avoir mesuré 80 à 90 cc. de l'acide chlorhydrique, on le dilua avec la moitié de son volume d'eau. Sa teneur en chlore était alors telle que 100 cc. du liquide correspondaient à environ 1 gr. de chlorure d'argent (comparez Jean-Servais Stas: Oeuvres complètes[1]). On acidula légèrement avec de l'acide nitrique, précipita avec un faible excès d' une solution ($^n/_3$) de nitrate d'argent. On ajouta ce précipitant par petites doses et en agitant bien; la précipitation était effectuée a la température ordinaire et sans accès de lumière blanche. Apres abandon jusqu'au lendemain, on filtra au travers d'un petit filtre. A l'abri de la lumière blanche, le chlorure argenté fut lavé à refus avec une solution très étendue de nitrate d'argent, d'abord par décantation, ensuite sur le filtre. Dans une pareille solution

[1]) 1894. T. I, p. 816.

très diluée de nitrate argente, solution qui par 1 gr. ne contient que 0gr,00006 de nitrate, le chlorure d'argent est, d'après Stas, tout à fait insoluble.

Le filtre avec le précipité, toujours imbibés de la solution faible de nitrate d'argent, fut pesé dans un pèse-filtre (Reinhardt), puis seché a 100° et pesé à nouveau. La différence entre ces deux pesées est égale au poids de la solution de nitrate argenté y adhérant, d'où l'on peut calculer la quantité de nitrate à défalquer plus tard du chlorure d'argent[1]).

Après avoir filtré encore une fois l'eau-mère et le liquide de lavage à travers un petit filtre, on recueillit sur ce dernier la petite quantité de chlorure d'argent obtenue en lavant les vases employés à l'eau ammoniacale fortement étendue, puis sursaturant celle-ci d'acide nitrique. Ici encore on lava d'abord à refus à la solution de nitrate d'argent, puis deux fois à l'eau.

Le chauffage du chlorure d'argent dans un courant de chlore fut effectué par le procédé habituel, après incinération préalable dans le creuset, des deux filtres.

Deux essais de ce genre ont donné:

N° 1. 93cc,78 d'acide chlorhydrique mesurés à 18°,5 = 93cc,81 mesurés a 20°, fournirent 1gr,3650 de chlorure d'argent, ce qui répond à un coefficient d'acide = 1,0148[2]).

N° 2. 83cc,84 d'acide chlorhydrique mesurés à 20°,5 = 83cc,83 mesurés a 20°, fournirent 1gr.2208 de chlorure d'argent, répondant à un coefficient d'acide = 1,0157.

La moyenne des coefficients d'acide trouvés de cette manière sera donc:

1.0153.

Ainsi nous avons trouvé:

Le coefficient d'acide déterminé			au moyen de l'oxalate de sodium.....	= 1,0159
—	—	—	par pesage du chlorure d'hydrogene	= 1,0154
—	—	—	au moyen de la teneur en chlore	= 1,0153

[1]) Le fait que lors du chauffage subséquent dans un courant de chlore, cette dose infime de nitrate argenté (0gr,0002) donne aussi du chlorure d'argent et change, par conséquent, de poids, est sans aucune conséquence.

[2]) Cl = 35,45; Ag = 107,93.

On voit donc que les étalonnages à l'oxalate de sodium ont donné une valeur d'environ $\frac{1}{2000}$ plus élevée que celle obtenue par les deux autres méthodes. Ainsi que nous l'avons indiqué plus haut, ce résultat tient à ce que nous avons titré jusqu'à coloration légèrement rose. Si nous avions choisi pour point terminal de nos titrages l'autre limite: la disparition de la couleur du liquide, il eût fallu pour chaque titrage une goutte d'acide en plus, et le coefficient d'acide eût été de $\frac{1}{1600}$ plus petit, c'est-à-dire qu'il aurait été inférieur à celui trouvé d'après les deux autres méthodes.

En terminant ce chapitre, nous croyons devoir attirer l'attention sur ce fait anciennement connu, mais auquel on n'a pas toujours eu égard: qu'un étalonnage titrimétrique ne saurait être considéré comme inattaquable, si l'on a déterminé un autre facteur que celui qui servira lors de l'emploi subséquent du liquide. Il est vrai qu'un étalonnage d'un acide chlorhydrique à l'aide d'un dosage exact de chlore conduit à peu près au même résultat qu'un étalonnage titrimétrique en présence de la phénolphtaléine; mais il faut s'être assuré au préalable de la pureté de l'acide chlorhydrique, car une teneur en chlorures ou en acide sulfurique — teneur qui ne nuit ordinairement pas à la valeur de l'acide chlorhydrique comme liqueur titrimétrique — sera susceptible de provoquer des erreurs; bref, il ne faut pas déterminer la teneur en ions chlore, si c'est celle en ions hydrogène qu'on aura intérêt à connaître plus tard.

Ainsi qu'on peut le voir par ce qui précède, l'étalonnage par pesée du chlorure d'hydrogène absorbé donne à peu près le même résultat que les étalonnages à l'aide de l'oxalate de sodium. Cependant on peut aussi soulever diverses objections contre ce mode d'étalonnage. D'abord, en effet, on détermine par là la quantité d'acide absolument exacte; mais lors de l'emploi subséquent, au lieu de titrer jusqu'à neutralisation précise de l'acide, on emploie toujours trop peu ou trop d'acide, selon la nature de l'indicateur utilisé. Afin d'éviter cette faute, l'étalonnage doit être fait titrimétriquement et avec le même indicateur que celui dont on se servira plus tard.

D'ailleurs, lors de l'étalonnage d'un acide chlorhydrique par pesage du chlorure d'hydrogène, on emploie d'autres appareils

de mesurage que ceux dont on fera usage ultérieurement, et en conséquence, même si l'on mesure et compare ces appareils avec l'exactitude la plus méticuleuse, avec les burettes à acide dont on aura à se servir, on aura à lutter continuellement avec des sources d'erreur qui n'existent pas du tout lorsque pour l'étalonnage on fait usage des mêmes appareils de mesurage que ceux qui ont à servir plus tard lors de l'emploi de la liqueur titrimétrique.

Décembre 1904.

4. SUR L'EMPLOI DES CARBONATE ET OXALATE SODIQUES COMME SUBSTANCES TYPES EN ACIDIMÉTRIE [1]).

PAR

S. P. L. SØRENSEN ET A. C. ANDERSEN.

Dans ses «Beiträge zur chemisch-technischen Analyse», G. Lunge[2] a indiqué que l'oxalate de sodium est une substance type sûre, si on le chauffe d'une manière spéciale décrite en détail dans son mémoire; mais même dans ces conditions, l'étalonnage opéré à l'aide de ce corps, donne pour l'acide une valeur de 0,1 % plus élevée que celle obtenue en se servant du carbonate sodique desséché d'après Lunge. La-dessus nous avons démontré[3] qu'un étalonnage au moyen de ce carbonate fournit à bien peu près la même valeur que celle obtenue par un étalonnage à l'oxalate sodique lorsque le chauffage de ce dernier s'effectue à l'aide de l'alcool et non pas du gaz d'éclairage qui, comme on sait, renferme toujours du soufre. D'ailleurs, dans ces circonstances, la manière dont la décomposition de l'oxalate a lieu est tout à fait indifférente, le résultat sera toujours le même; seulement il faut, bien entendu, éviter de chauffer au début si fortement qu'il se produirait subitement un violent dégagement d'air, et à la fin il est indispensable d'augmenter la chaleur au point

[1]) Publié en allemand dans la Zeitschr. für anal. Chemie, **45**, pp. 217 à 231 (1906).

[2]) Zeitschr. für angew. Chemie, **17**, 231 (1904).

[3]) Voir le mémoire précédent.

que tout le charbon puisse être consumé; que le carbonate sodique formé en même temps fonde ou non, cela n'a aucune importance.

Dernièrement Lunge, ayant repris cette question [1]), a trouvé, conformément à nos résultats, que l'étalonnage au moyen de l'oxalate de sodium donne, quand on chauffe sur la flamme d'un bec de gaz, un chiffre d'acide légèrement supérieur à celui auquel on arrive en employant l'alcool comme source de chaleur. Mais en même temps il a constaté qu'on est à même d'éviter l'action nuisible des produits de combustion du gaz en plaçant, pendant la durée de la chauffe, le creuset à l'oxalate sodique dans un trou approprié ménagé dans une plaque d'amiante. Or nous avons nous aussi fait l'épreuve de ce mode de chauffage et n'avons jamais pu déceler d'acide sulfurique dans le sel décomposé, en sorte que nous pouvons le recommander en toute sécurité.

Il peut donc maintenant être considéré comme établi que, même quand on aspire à la précision la plus grande possible, le carbonate de sodium (desséché d'après Lunge) et l'oxalate de sodium (d'après Sørensen), employés comme substances types en acidimétrie, donnent des résultats également satisfaisants; seulement, lors de la décomposition de l'oxalate, il faut bien avoir soin, ou de se servir comme source de chaleur d'une lampe à alcool, ou d'employer le dispositif employé par Lunge.

Si néanmoins nous croyons utile de revenir à cette question, c'est parce quil y a encore quelques points sur lesquels nous ne sommes pas d'accord avec Lunge, et qui — même s'ils peuvent paraître insignifiants en comparaison du resultat principal que nous venons d'énoncer — nous semblent pourtant suffisamment importants pour mériter quelques explications. Ces points sont les suivants:

1° Dans la soude desséchée d'après Lunge, nous avons rencontré de très petites quantites d'hydroxyde de sodium, tandis que Lunge n'y en a pu découvrir qu'une trace absolument négligeable.

2° Nous avons considéré l'oxalate sodique comme n'étant

[1]) Zeitschr. für angew. Chemie, **18**, 1520 (1905).

pas hygroscopique, alors que dans son dernier mémoire Lunge prétend

«dass das Natriumoxalat denn doch nicht so absolut frei von Hygroskopizität ist, wie dies hingestellt worden ist, und dass es, ebensogut wie die Soda, vor dem Gebrauche getrocknet werden muss, wenn man es als sichere Ausgangssubstanz benutzen will.»

Sur le premier de ces deux points Lunge a raison; pour ce qui concerne le second, il fait erreur.

1. La soude séchée d'après Lunge renferme-t-elle de l'hydroxyde de sodium? Par les recherches de F. W. Kuster et Max Gruter[1] on sait que la solution de soude, surtout à chaud, cede de l'acide carbonique à une atmosphère qui en est privee. C'est pourquoi lorsque nous avons élaboré l'épreuve relative à la présence d'hydroxyde sodique dans le carbonate de sodium[2], nous avons évité à dessein tout chauffage de la solution de soude: avant d'ajouter le carbonate de sodium et — après dissolution de celui-ci — le chlorure de baryum, nous avons laissé l'eau bouillie se refroidir à l'abri de l'acide carbonique atmosphérique.

Lunge dit, il est vrai, qu'il a exécuté cette épreuve exactement d'apres nos indications, mais il ressort de sa description que — probablement sans s'en rendre compte — il a introduit cette modification qu'il a ajouté la soude et le chlorure barytique à l'eau bouillie et encore chaude, pour ne refroidir qu'ensuite dans un courant d'air privé d'acide carbonique. Or nous avons examiné relativement à l'hydroxyde de sodium le même échantillon de soude, aussi bien de la manière primitive (dissolution et précipitation à froid) que par le procédé modifié (dissolution et précipitation a chaud), et nous avons trouvé de cette dernière façon une teneur en hydroxyde sodique très inférieure à celle constatée primitivement. Sans doute, en employant ce dernier procédé on se rapproche davantage de la réalité; car il est impossible de voir comment par cette méthode on trouverait une alcalinité trop basse (La proportion d'alcali ne peut diminuer, pas plus que l'acide ne peut augmenter, pourvu toutefois qu'on ait soin que l'air que l'on y fait passer soit bien réellement exempt d'acide carbonique).

[1]) Ber. der d. chem. Ges., **36**, 748 (1903).

[2]) Voir le précédent memoire, p. 146.

On peut maintenant se demander: En quoi le procédé primitif est-il défectueux? pourquoi donne-t-il une alcalinité trop forte? — Il est évident qu'il ne peut pas être question d'un apport d'alcali, et il paraît donc que le défaut provient de ce qu'il y a élimination d'acide par suite d'une précipitation d'un peu de bicarbonate en même temps que celle du carbonate de baryum. Nous n'ignorons pas que, selon l'opinion généralement admise, le bicarbonate de baryum n'existe pas à l'état solide et que, additionné de chlorure de baryum, même le bicarbonate sodique donne lieu à une précipitation de carbonate barytique; mais néanmoins, nous ne comprenons pas comment on pourrait expliquer le phénomène en question autrement qu'en admettant que, mélangée de chlorure de baryum, une solution de carbonate sodique — laquelle, on le sait, est partiellement hydrolysée en hydroxyde et bicarbonate sodiques, — donne naissance à du carbonate barytique mélangé d'une trace de bicarbonate.

Cette explication trouve son appui dans les essais que nous allons décrire et qui feront voir que l'alcalinité primitivement forte d'une solution de carbonate sodique precipitée à froid par le chlorure de baryum, diminue d'une façon très appréciable, si on la chauffe et puis la laisse refroidir, ou si on la laisse séjourner plusieurs heures à froid, bien entendu à l'abri de toute trace d'acide carbonique, si faible soit-elle.

1ère série d'essais (Merck: Kohlensaures Natrium, chemisch rein, wasserfrei, pro analysi. Desséché d'après Lunge à 270° à 295° pendant une demi-heure, puis refroidi au-dessus d acide sulfurique et d'hydroxyde de potassium).

a. On fit dissoudre 4 gr. de soude dans 200 cc. d'eau bouillie, puis refroidie, additionnée de phénolphtaléine et d'ailleurs traitée exactement comme décrit précédemment *(loc. cit.)*. On précipita par 17 gr. de chlorure de baryum. Ce n'est qu'après addition de 1 cc,2 d'acide chlorhydrique normal au 1/10 que la liqueur rouge devint presque incolore (après que le précipité se fut réuni au fond, la liqueur accusa une teinte rose extrêmement faible).

b. 4 gr. de soude furent traités de la même façon qu'en a), à ceci près que la soude et ensuite le chlorure de baryum furent ajoutés à l'eau bouillie pendant qu'elle était encore chaude; ce n'est qu'alors qu'on fit refroidir et qu'on titra de la manière habituelle. Déjà après addition de 0 cc,27 d'acide chlorhydrique normal au 1/10, la liqueur était presque incolore.

c. Après avoir précipité à froid 4 gr. de soude par le chlorure barytique comme en a), on chauffa jusqu'à commencement d'ébullition, puis refroidit à nouveau, en continuant de faire passer l'air exempt d'acide carbonique. Enfin, on titra par le procédé habituel. Après

addition de $0^{cc},34$ d'acide chlorhydrique normal au $^1/_{10}$, la liqueur était presque incolore.

2e série d'essais. (La soude était de même sorte et desséchée de la même manière que dans la 1ère série). On fit quatre titrages, chacun avec 4 gr. de soude; toutes les précipitations furent opérées à froid, et ensuite les fioles (remplies d'air privé d'acide carbonique et fermées par des bouchons en caoutchouc) furent laissées en repos pendant des temps inégaux et en secouant à plusieurs reprises, pour être finalement titrées jusqu'à disparition de la couleur, toujours à l'abri de l'acide carbonique de l'atmosphère. Le résultat fut le suivant:

a) Titration immédiatement; exige $1^{cc},1$ d'ac. chlorh. norm. au $^1/_{10}$
b) — au bout de $1\ ^1/_2$: — $0^{cc},8$ — — — —
c) — — — 6^h ; — $0^{cc},7$ — — — —
d) — — — 25^h ; — $0^{cc},5$ — — — —

On voit en résumé, que la soude qui, titrée d'après la méthode habituelle, exigeait environ $0^{cc},3$ d'acide chlorhydrique normal au $^1/_{10}$ par gramme, ne demandait par le procédé modifié (précipitation a chaud) qu'une comsommation, par gramme de soude, de $0^{cc},07$ à $0^{cc},08$ d'acide chlorhydrique normal au $^1/_{10}$. La quantité d'hydroxyde de sodium qui se laisse calculer par ces chiffres, est si minime que nous sommes parfaitement d'accord avec Lunge pour la considérer comme négligeable: on peut se dispenser d'en tenir compte même dans des analyses très rigoureuses.

Conformément à ce qui a été dit, l'épreuve relative à l'hydroxyde de sodium faisant partie du carbonate de sodium, se laisse le mieux exécuter de la manière suivante:

Dans une fiole conique en verre d'Iéna, on fait bouillir 200 cc. d'eau additionnée de phénolphtaléine, en la faisant traverser continuellement par de l'air débarrassé de son acide carbonique. A l'eau encore chaude ainsi réduite à la moitié de son volume, on ajoute 2 gr. de l'échantillon de carbonate sodique à examiner et, après la dissolution de celui-ci, 8 gr. de chlorure de baryum, tout en continuant à faire passer le courant d'air exempt d'acide carbonique. Après avoir bien secoué, puis fait refroidir dans de l'eau, on verse dans la liqueur, si elle est de couleur rouge, de l'acide chlorhydrique normal au $^1/_{10}$ jusqu'à disparition de la couleur[1]).

2. L'oxalate de sodium est-il hygroscopique? Dans son dernier mémoire[2]) Lunge s'est également occupé de cette

[1]) Voir d'ailleurs le mémoire précédent, pp. 146—148.
[2]) *loc. cit.*

question, et a trouvé que 5 gr. d'oxalate de sodium laissés pendant 1 mois au-dessus de l'eau dans un exsiccateur, ont absorbé 0gr,0188 d'eau (dans un autre essai 0gr,0252). Lunge convient, il est vrai, qu'il ne viendra guère à l'idée de personne de conserver de l'oxalate sodique dans de pareilles conditions; mais néanmoins il tire de ses essais cette conclusion, que l'oxalate, aussi bien que la soude, doit être séché avant chaque emploi, si l'on veut l'utiliser comme étalon. A cela il faut cependant remarquer qu'il n'existe guère de substance qui, conservée dans une atmosphère saturée de vapeur d'eau, ne se recouvre d'une couche d'humidité, et la quantité d'eau adhérente dépendra naturellement de l'étendue de la surface; mais un corps ne peut être qualifié d'hygroscopique s'il cède cette eau aussitôt qu'il est placé dans une atmosphère qui n'est pas complètement saturée d'humidité, telle que l'air atmosphérique.

L'essai que nous allons exposer fera voir qu'il en est bien ainsi de l'oxalate de sodium.

Environ 20 gr. d'oxalate de sodium furent pesés exactement dans un flacon à tare, dans lequel se trouvait en même temps une petite spatule en verre pour remuer la matière. Comme tare on se servait d'un flacon similaire et que pendant tout le cours de l'essai on soumettait au même traitement que le premier.

Les deux flacons furent d'abord séchés pendant vingt-quatre heures dans le vide à 110°. L'oxalate sodique perdit ainsi 0gr,0016, c'est-à-dire qu'il renfermait 1 : 12500 d'eau hygroscopique; dans le même lot d'oxalate sodique de Kahlbaum, la teneur en eau deux ans auparavant avait été trouvée de 1 : 12000[1]).

Ensuite les deux flacons, bien entendu non bouchés, furent placés sous une cloche de verre, sous laquelle se trouvait en même temps un gobelet rempli d'eau, dans laquelle un morceau de papier-filtre trempait comme une mèche. Au moyen de papier imbibé d'eau, l'air renfermé dans la cloche était maintenu saturé d'humidité. Après quelques jours déjà, le poids de l'oxalate sodique était devenu constant; le sel est resté ainsi pendant 12 jours en remuant fréquemment, et l'augmentation de poids était de 0gr,0224. Alors le papier-filtre fut enlevé, et les flacons remis à nouveau sous la cloche, à côte du gobelet contenant de l'eau mais privé de la mèche. L'oxalate sodique perdit ainsi en vingt-quatre heures 0gr,0138, soit plus de la moitié de l'eau absorbée; au bout des vingt-quatre heures suivantes, la perte n'était que de 0gr,0012.

Enfin les flacons furent placés dans l'air ordinaire, à l'abri des poussières. Dans ces conditions, l'oxalate perdit en deux jours 0gr,0056, puis en trois jours 0gr,0005; ensuite le poids demeurait constant.

[1]) Voir le précédent mémoire, p. 142.

Des $0^{gr},0224$ qu'il avait absorbés, l'oxalate avait ainsi cédé $0^{gr},0138 + 0^{gr},0012 + 0^{gr},0056 + 0^{gr},0005 = 0^{gr},0211$; de sorte que la teneur en eau de l'oxalate était alors, pour ainsi dire, la même qu'avant l'essai: $0^{gr},0016$ (voir plus haut).

Afin d'établir si les agitations ou les autres manipulations n'avaient pas donné lieu à des pertes, les flacons furent encore séchés dans le vide à 110^{0} pendant vingt-quatre heures. Ce temps écoulé, l'oxalate pesait $20^{gr},0360$, alors que, à la suite de la première dessiccation à 110^{0}, son poids était de $20^{gr},0356$.

Lunge a également examiné l'hygroscopicité de la soude, en procédant comme suit:

«5 g. der Soda wurden in einem gut schliessenden Wägeglas im Exsiccator aufbewahrt und jeden Tag eine Kontrollwägung des Wägeglases vorgenommen».

«Die 5 g. Soda hatten in 14 Tagen um 1.3 mg., also um 0.026 % an Gewicht zugenommen».

Mais de cette façon on n'arrive évidemment point du tout à constater si la soude est hygroscopique ou si elle ne l'est pas, mais seulement si le flacon ou l'exsiccateur employés joignent bien ou non.

En vue de pouvoir examiner quelle est l'influence exercée par l'hygroscopicité de la soude dans l'étalonnage d'un acide, on peut s'arranger de la façon indiquée par John Sebelien[1]). Ce chimiste conserve une quantité notable de soude desséchée d'après Lunge, dans un flacon à tare bouché à l'éméri, et de cette soude il pèse pour les étalonnages d'acide ordinaires, une portion dans un creuset de platine, en repesant en même temps le flacon. Sebelien constata alors que, quoique l'air ait été assez sec (température 20^{0}, degré d'humidité 24 %), l'absorption d'eau de la soude était très accusée; l'augmentation de poids du creuset était toujours supérieure à la diminution de poids du flacon. Le poids total de 5 portions de soude pesées était de $5^{gr},9361$, tandis que la diminution totale du poids du flacon ne représentait que $5^{gr},9322$, donc une différence de 4 mgr. environ.

Nous avons opéré d'une manière analogue; seulement nous n'avons pas pesé chaque portion de soude dans un creuset de platine, mais dans un petit flacon à tare bien bouché, en employant un flacon semblable comme tare; ensuite nous avons enlevé la soude et repesé le flacon. Nous avons pesé ainsi 5 portions de soude, et après la dernière pesée, le flacon, ayant

[1]) Chemiker Zeitung, **29**, Nr. 47 (1905).

été nettoyé, a été repesé de nouveau afin de déterminer la quantité insignifiante de soude restée attachée à la paroi du flacon. La portion principale de la soude était conservée dans un grand flacon à tare renfermant, en même temps, une petite spatule en verre et muni d'un bon bouchon. Ce flacon était pesé avant et après le dernier prélèvement de soude, en se servant d'un flacon semblable comme tare. On a effectué le transvasement de la soude aussi rapidement que possible, afin de ne pas la laisser exposée à l'humidité de l'air plus longtemps qu'il n'était nécessaire, et en tout cas pas plus longtemps que lors d'une pesée habituelle. Le résultat fut le suivant:

Le poids de la première portion de soude était de	$0^{gr},3140$
— — deuxième — —	$0^{gr},4381$
— — troisième — —	$0^{gr},6842$
— — quatrième — —	$0^{gr},5013$
— — cinquième — —	$0^{gr},4925$
— — soude restée attachée au verre....	$0^{gr},0002$
En tout..	$2^{gr},4303$

La portion principale pesait avant le premier prélèvement.....	$16^{gr},5975$
— — — après le dernier prélèvement.....	$14^{gr},1700$
Différence..	$2^{gr},4275$

La différence entre $2^{gr},4303$ et $2^{gr},4275$ est de $2^{mgr},8$; l'erreur à laquelle ont donné lieu les 16 pesées que nous avons effectuées, est de $1^{mgr},6$ au plus; donc, d'après cet essai, la quantité d'eau absorbée lors d'une pesée de soude a une valeur minima de $\frac{2,8-1,6}{5} = 0^{mgr},24$; c'est-à-dire 1:2000 de la totalité de soude pesée (env. $0^{gr},5$). On voit aussi bien par les essais de Sebelien que d'après les nôtres que, lorsqu'il s'agit de travaux bien minutieux, il est indispensable d'abriter la soude très soigneusement contre l'humidité de l'air.

Nous avons entrepris un essai tout à fait analogue sur l'oxalate de sodium et, comme on pouvait s'y attendre, nous n'avons pu constater d'absorption d'eau.

Poids de la première portion d'oxalate ...	$0^{gr},5655$
— - - deuxième — — ...	$0^{gr},6553$
— - - troisième — — ...	$0^{gr},3949$
— - - quatrième — — ...	$0^{gr},6029$
— - - cinquième — — ...	$0^{gr},4622$
— - l'oxalate adhérent au verre	$0^{gr},0013$
En tout...	$2^{gr},6821$

La portion principale de l'oxalate de sodium pesait	
avant le premier prélèvement	$20^{gr},0360$
après le dernier —	$17^{gr},3529$
Différence ...	$2^{gr},6831$

La différence entre $2^{gr},6821$ et $2^{gr},6831$ est de $\div 1^{mgr},0$, c'est-à-dire qu'elle ne dépasse pas l'erreur due aux pesages (voir plus haut).

Nous ne pouvons terminer ce chapitre sans insister sur l'inaltérabilité de l'oxalate. Dans la fabrication (maison C. A. F. Kahlbaum à Berlin ce produit, après avoir été desséché à 240°, est exposé à l'action de l'air atmosphérique, ce qui a pour effet qu'il se recouvre d'une couche d'humidité, dont le poids dépend naturellement jusqu'à un certain point de la grandeur des grains du sel et qui, en général, représente 1 : 10,000 de celui de l'oxalate. C'est à cet état qu'on le met dans le commerce, et il s'est trouvé être d'une parfaite conservation. Dans tous les étalonnages ordinaires d'acides ou de solutions de permanganate, on peut faire abstraction de cette faible proportion d'eau. Mais il est recommandable de se procurer en une fois une assez importante portion (soit 1 kilogr.) d'oxalate sodique et de le soumettre aux épreuves relatives à la pureté[1]), épreuves qui comprendront encore la détermination de la proportion d'eau hygroscopique[2]). Ainsi que nous l'avons vu, elle représente ordinairement 0,01 %. Une fois cette grandeur déterminée,

[1]) Voir ces mêmes Comptes-rendus, p. 135.

[2]) Je profite de cette occasion pour rectifier ma description de cette épreuve (*loc. cit.*, p. 136): les mots «au-dessus d'eau» de la dernière phrase doivent être remplacés par «à l'air», ce qui donne la phrase suivante: lorsque ensuite on fait séjourner l'oxalate à l'air, il ne doit pas réabsorber plus d'un milligramme d'humidité.

on peut, si l'on veut absolument compter avec de pareilles quantités minimes, introduire la correction correspondante dans toute pesée ultérieure de l'oxalate, puisque celui-ci n'éprouve aucune altération même après une conservation de plusieurs années.

Enfin nous avons encore à ajouter quelques remarques relatives à la question *méthylorange* ou *phénolphtaléine?* Il faut remarquer à ce propos que cette question est absolument indépendante du choix de l'oxalate ou du carbonate sodiques, étant donné que l'oxalate chauffé se comporte vis-a-vis de ces deux indicateurs exactement de la même manière que le carbonate. Nous devons également faire observer que nous n'entendons nullement contester la valeur du méthylorange pour les travaux analytiques journaliers; seulement nous croyons devoir préférer la phénolphtaléine lorsqu'il s'agit de recherches où l'on tient à la plus grande précision possible, et cela quand même son emploi donnerait un travail un peu plus compliqué. A ce propos, il n'est peut-être pas inutile de rappeler que la concordance constatée entre des essais exécutés d'une même manière, ne signifie pas toujours qu'on puisse obtenir ce même degré dans des conditions expérimentales différentes, si peu modifiées soient-elles.

Il paraît que Lunge n'a pas bien saisi nos remarques sur la question des indicateurs; car dans son dernier mémoire il insiste à plusieurs reprises très fortement sur ce fait que les points neutres apparents ne peuvent point coïncider dans les titrages à la phénolphtaléine et au méthylorange. C'est tout à fait exact, et nous n'avons jamais écrit et encore moins pensé autrement. Nous avons même encore été plus loin en insistant sur ceci[1] : «Du moins lorsqu'il s'agit d'analyses très exactes, on ne peut pas sans autre faire usage d'une solution étalonnée au méthylorange; il faut toujours avoir bien soin que dans les titrages on soit en présence de la même teneur en acide carbonique que lors de l'étalonnage». Personne ne contestera qu'au point de vue purement théorique cette proposition ne soit irréfutable et qu'elle ne nécessite pas d'explica-

[1]) Ces mêmes Comptes-rendus, p. 160.

tions, si l'on songe que le virage du méthylorange signifie simplement que la concentration en ions hydrogène du liquide considéré a atteint ou dépassé une certaine grandeur peu élevée et qu'une teneur différente en acide carbonique peut entrainer une variation appreciable dans ladite concentration. Il s'agit, par conséquent, de déterminer jusqu'à quel point la proportion variable d'acide carbonique peut influencer le résultat d'une titration faite en présence du methylorange. Or, il ressort, d'une part des essais de F. W. Kuster[1]), lesquels nous avons pu confirmer en tous points *loc. cit.* p. 156), et d'autre part de ceux de Lunge, que l'influence exercée par l'acide carbonique est telle qu'on ne peut pas se dispenser de la faire entrer en ligne de compte dans les analyses minutieuses.

Nous allons mentionner dans quelque détail les essais de ce dernier savant. Dans ses «Beiträge zur chemisch-technischen Analyse»[2]) il cite trois différents groupes d'étalonnages en vue d'éclaircir cette question:

a. (*loc. cit.*, p. 200 et 201). Une lessive de soude fut étalonnée avec un acide chlorhydrique normal au $^1/_5$, soit en présence de méthylorange (sans élimination de l'acide carbonique), soit en présence de phénolphtaléine (avec élimination de l'acide carbonique). Les coefficients de la lessive étaient les suivants:

	Méthylorange	Phénolphtaléine
Dans la première série d'essais..	1,0000	0,9995
— - seconde — — ..	1,0000	0,9999—1,0002

On voit que Lunge trouve ici les mêmes coefficients pour l'un et l'autre des indicateurs[3]).

b. (*loc. cit.*, p. 201): Une solution de baryte fut étalonnée comme plus haut relativement à un acide chlorhydrique normal au $^1/_5$, aussi bien avec le méthylorange qu'avec la phénolphtaléine. Les chiffres trouvés pour le coefficient de la solution barytique étaient les suivants:

[1]) Zeitschr. für anorg. Chemie, **13**, 137 (1896).

[2]) Zeitschr. für angew. Chemie, **17**, 195, 225 et 265 (1904).

[3]) Dans notre précédent mémoire nous avons écrit que Lunge a trouvé dans ses essais à peu près *(ungefähr)* le même coefficient dans le cas du méthylorange que dans celui de la phénolphtaléine. Dans son dernier mémoire (p. 1524) Lunge dit à ce sujet: «dass «ungefähr» zeigt ja aber schon, dass eben doch ein Unterschied vorhanden wäre»; s'il s'était donné la peine d'examiner ses propres chiffres, il n'eût certainement pu se méprendre sur ce que nous avons voulu dire par ce mot «ungefähr».

Méthylorange	Phénolphtaléine
1,2324	1,2270

c. (*loc. cit.*, p. 201): Un acide (normal au $^1/_5$ env.) fut étalonné relativement à la soude anhydre, comme plus haut, soit avec le méthylorange, soit avec la phénolphtaléine. Voici les chiffres trouvés pour le coefficient de l'acide:

Méthylorange	Phénolphtaléine
1,0301	1,0276

Contrairement aux résultats obtenus par les essais décrits immédiatement auparavant en a), dans son mémoire, Lunge, dans les deux dernières séries d'essais, trouve des coefficients tout différents avec le méthylorange et avec la phénolphtaléine; mais il ne donne pas plus d'explications de cette contradiction apparente qu'il n'a fait observer que dans la série b il trouve le coefficient de la solution de baryte plus grand en présence de méthylorange que dans le cas de phénolphtaléine, alors que dans la série c il trouve, inversement, le coefficient de l'acide plus grand en employant le méthylorange. Nous ne voyons cependant pas, comme Lunge le prétend (*loc. cit.*, p. 1524), de contradiction réelle dans ces essais: nous n'avons parlé que d'une contradiction apparente, et nous avons montré que celle-ci s'explique tout simplement par ce fait que les quantités d'acide carbonique n'ont pas été les mêmes lors des différentes titrations.

En admettant l'exactitude des coefficients trouvés par le titrage à la phénolphtaléine avec élimination de l'acide carbonique, il faut en conclure que dans la titration en présence de méthylorange dans la série c), titration opérée à l'aide de la soude et où, par conséquent, il y avait beaucoup d'acide carbonique, on a consommé trop peu d'acide, ce qui a eu pour conséquence un coefficient d'acide trop élevé, tandis que dans la série b — où l'on a employé du baryte et où, par suite, il n'y avait pas d'acide carbonique, — on a inversement consommé trop d'acide, de sorte qu'on a trouvé un trop petit coefficient d'acide ou, ce qui revient au même, un trop grand coefficient de baryte. Ces données nous font comprendre que dans la série a) on a employé une lessive de soude renfermant de l'acide carbonique en quantité telle que le coefficient de méthylorange devait nécessairement coïncider avec celui de phénolphteléine. (D'après quelques titrages effec-

tués par Lunge à l'aide de la phénolphtaléine sans élimination de l'acide carbonique, la lessive contenait à l'état de carbonate, environ 4 % de la teneur totale en soude).

Il résulte de ces essais qu'un acide étalonné au moyen de la soude en présence du méthylorange, ne peut servir à la titration d'une solution de baryte à l'aide de ce même indicateur; calculée d'après les chiffres cités plus haut, l'erreur s'élèverait à 0,44 + 0,24 = 0,68 % (voir le tableau p. 181). Lunge en convient dans son dernier mémoire (p. 1524, tout en ajoutant: «Für Methylorange kommt Barytlösung wirklich gar nicht in Betracht».

On voit, en outre, qu'il n'est également pas admissible, sans autre, d'effectuer la titration d'une lessive de soude en présence du méthylorange au moyen d'un acide étalonné à l'aide de la soude en présence du même indicateur.

Lunge écrit bien dans son dernier mémoire (p. 1524): «Um nun beim Titrieren mit Methylorange immer auf die Mischfarbe oder Normalfarbe zu kommen, entsprechend einer gewissen Minimalkonzentration von Wasserstoffionen, ist allerdings eine gewisse Menge von Kohlensäure erforderlich. Diese stellt sich aber beim Titrieren von kohlensauren Salzen ohne weiteres ein, und beim Titrieren von kaustischen Alkalien durch Säuren oder umgekehrt ist in der Praxis so gut wie immer genügend Kohlensäure aus den Laugen, dem Verdünnungswasser und der Luft vorhanden».

Les propres essais de Lunge mentionnés plus haut, font cependant voir qu'il n'en est pas ainsi. La lessive de soude dont il s'est servi, et dans laquelle environ 4 % de la soude sont à l'état de carbonate, donne le même coefficient par titration en présence du méthylorange qu'en présence de la phénolphtaléine. Que l'on veuille maintenant titrer cette lessive en présence du méthylorange et au moyen d'un acide étalonné avec la soude en présence du méthylorange comme dans la série c), l'erreur qu'on commettrait représenterait 0,24 % de la teneur totale en sodium. La manière la plus simple par laquelle on peut tourner cette *sensibilité vis-à-vis de l'acide carbonique* du méthylorange, nous semble consister à titrer toujours — ainsi que nous l'avons déjà indiqué dans notre précédent mémoire (p. 161) — en liqueur saturée d'acide carbonique jusqu'à la *couleur normale* de Küster, en sorte qu' avant la fin de la titration, une lessive de soude doit être saturée d'acide carbonique.

Maintenant Lunge, lui aussi, fait la titration jusqu'à la *couleur normale* de Küster, laquelle n'est cependant pas identique à la couleur de virage dont il se servait autrefois. Dans ses essais antérieurs cités plus haut, il a trouvé avec la phénolphtaléine (liqueur exempte d'acide carbonique) le coefficient d'acide égal à 1,0276, et avec le méthylorange (titré jusqu'à coloration brune; liqueur saturée d'acide carbonique) 1,0301, ce qui veut dire que la différence entre le coefficient de phénolphtaléine et celui de méthylorange, est de ÷ 0,0025, soit ÷ 0,24 %. Dans son dernier mémoire — où il décrit ainsi la couleur de virage (*loc. cit.*, p. 1523): «Die von mir vorgeschriebene Mischfarbe oder Übergangsfarbe = Küsters «Normalfärbung», das heisst bräunlich; andere nennen es orange, was aber nur bei zu grosser Konzen-

Tableau VI. *Grandeur du coefficient d'acide.*

	Phénolphtaléine (Rose) Milieu exempt d'acide carbonique	*Méthylorange* (Virage très net)		*Méthylorange* (Coul. normale de Küster). Milieu saturé d'acide carbonique	Différences exprimées en pourcentage par rapport à a		
		Milieu exempt d'acide carbonique	Milieu saturé d'acide carbonique				
	a	b	c	d	a—b	a—c	a—d
Lunge[1]..... Zeitschr. für angewandte Chemie **17**, 201 (1994).	0,8150	0,8114	—	—	+0,44	—	—
Lunge ..... *Ibidem.*	1,0276	—	1,0301	—	—	÷0,24	—
Lunge ..... *Ibidem* **18**, 1524 (1905).	1,0028(5)	—	—	1,0010	—	—	+0,18
Lunge ..... *Ibidem* 1527.	1,00195	—	—	1,0006	—	—	+0,13
Lunge ..... *Ibidem.*	1,0020	—	—	1,0009	—	—	+0,11
Sørensen et Andersen[2]) ..... Ces mêmes Comptes-rendus.	0,9429	0,9354	0,9447	0,9405	+0,80	÷0,19	+0,25

[1]) Dans le mémoire de Lunge on trouve indiqués les coefficients de la solution des bases, c'est-à-dire les valeurs réciproques de celles donnés ici.

[2]) Dans notre mémoire nous avons également indiqué les coefficients des solutions de bases, coefficients réciproques de ceux consignés ici

(Par ex. $\frac{100}{106,06} = 0,9429$).

tration des Indikators passt», — il a, par contre, toujours trouvé pour la différence en question un chiffre positif, ainsi qu'on le verra par le tableau ci-dessous. A la description de ces derniers essais Lunge ajoute les remarques suivantes (*loc. cit.*, p. 1527):

»Bei den in meinem Berichte von 1903 beschriebenen, von einer Anzahl verschiedener Mitarbeiter in meinem Laboratorium angestellten Versuchen waren die Vorsichtsmassregeln nicht so peinlich wie jetzt beobachtet worden, weshalb ich auf jene Versuche in diesem Zusammenhange keinen entscheidenden Wert legen kann».

Nous ne savons pas si Lunge veut dire par là qu'on ne peut se fier entièrement aux essais qu'il a publiés antérieurement; mais nous devons ajouter que les résultats qu'on peut en déduire, s'accordent d'une façon générale avec nos expériences, ainsi que cela ressort du tableau ci-après:

Conclusions. Nous pouvons donc à nouveau résumer comme suit la manière de voir à laquelle nous ont conduits les essais relatés dans ce qui précède:

1° Dans les analyses habituelles la titration ordinaire au méthylorange peut rendre de réels services grâce à sa grande simplicité; tandis que

2° dans les analyses où l'on cherche à obtenir la plus grande précision possible, il faut ou employer la titration modifiée au méthylorange — c'est-à-dire titrer en liqueur saturée d'acide carbonique jusqu'à la *couleur normale* de Küster — ou bien, de préférence, se servir de la phénolphtaléine comme indicateur.

Décembre 1905.

5. LA MÉTHODE DE WINKLER POUR LE TITRAGE DES HYDROXYDES ALCALINS A COTÉ DE CARBONATES ALCALINS, DONNE-T-ELLE DES RÉSULTATS EXACTS?[1]

PAR

S. P. L. SØRENSEN ET A. C. ANDERSEN.

Au cours de la discussion qui eut lieu il y a quelques années au sujet de l'emploi des carbonate et oxalate sodiques comme substances types en acidimétrie[2]), une question importante s'est posée: celle de savoir si le carbonate sodique desséché d'après Lunge à une température comprise entre 270° et 300° est ou n'est pas parfaitement exempt d'hydroxyde; en même temps on discutait la manière dont il faudrait procéder pour le démontrer.

La discussion de cette double question aboutit à ce résultat[3]) que dans un échantillon de carbonate sodique séché d'après Lunge, la teneur en hydroxyde de sodium est si minime que dans toutes les analyses mêmes très exactes, on peut en faire abstraction. En même temps il fut démontré que dans l'épreuve relative à l'hydroxyde sodique du carbonate il convient d'effectuer à chaud la précipitation au chlorure de baryum, parce que lors d'une précipitation à froid l'alcalinité est trop élevée, probablement à cause de ce qu'à froid il se précipite un peu de bicarbonate de baryum.

Aussi avons-nous été très surpris d'apprendre que M. le Blanc soit arrivé à un résultat contraire. En effet, dans une étude publiée l'année dernière[4]) M. le Blanc et K. Novotny ont indiqué que les solutions entièrement neutres de chlorure de baryum deviennent acides lorsqu'on y ajoute des solutions

---

[1]) Publié en allemand dans la Zeitschr. für anal. Chemie, **47**, 279 (1908). — Comparez F. W. Küster: Zeitschr. für anorg. Chemie, **13**, 129 (1896).

[2]) S. P. L. Sørensen: Bulletin de la Société Royale de Danemark, 1900, p. 189. G. Lunge: Zeitschr. für angew. Chemie, **17**, 195, 225, 265 (1904); **18**, 1520 (1905). — J. Sebelien: Chem.-Zeitung, **29**, N° 47 (1905). — S. P. L. Sørensen et A. C. Andersen: Comptes-rendus du Laboratoire de Carlsberg, **9**, 140 et 168. Bericht der internationalen Analysen-Kommission in Rom, 1906, p. 71 (2. Unter-Kommission, W. Fresenius).

[3]) Voir ces mêmes Comptes-rendus, **9**, 172.

[4]) «Über die Kaustisierung von Natriumcarbonat und Kaliumkarbonat mit Kalk»: Zeitschr. für anorg. Chemie, **51**, 181 (1906).

normales au $^1/_{10}$ de carbonates alcalins purs, et dans un travail ultérieur[1] M. le Blanc a pu confirmer ce résultat en s'appuyant sur de nouveaux essais.

Ce point est d'une assez grande importance, car il ne s'agit pas seulement de savoir si l'épreuve recommandée par nous[2]) pour déterminer l'hydroxyde de sodium contenu dans le carbonate de sodium est propre à servir, mais aussi — comme M. le Blanc le fait remarquer — si la méthode de Winkler pour la détermination des hydroxydes alcalins à côté des carbonates alcalins est sure ou non. C'est pourquoi nous avons repris cette question, et en renvoyant pour ce qui concerne les détails à l'exposé qui va suivre, nous pouvons résumer comme suit nos résultats, qui en tous points viennent à l'appui de nos observations antérieures et complètent celles-ci:

1° Lorsqu'on fait précipiter à chaud des solutions de carbonates alcalins normaux et purs au moyen d'un excès de chlorure de baryum, il ne se sépare que du carbonate barytique pur; si, au contraire, la précipitation a lieu à la température ordinaire, il se précipite plus au moins de sel acide, et la liqueur surnageante devient nettement alcaline. Si le Blanc a obtenu une liqueur acide non seulement par précipitation à froid mais aussi à chaud, c'est, sans aucun doute, parce que sa solution de carbonate alcalin a renfermé en même temps du bicarbonate.

2° Si la solution de carbonate alcalin contient des hydroxydes alcalins, il se précipite à chaud, en dehors du carbonate barytique normal, un sel basique dont la proportion sera d'autant plus forte que la teneur en hydroxyde alcalin est plus élevée. Les solutions renfermant des bicarbonates ne se laissent naturellement pas précipiter à chaud sans perte d'acide carbonique.

3° Conformément à ce que nous venons de dire, la méthode de Winkler ne donne de résultats sûrs que si la précipitation est opérée à chaud et dans des solutions ne renfermant que des carbonates normaux, ou tout au moins presque seulement de ceux-là. C'est pourquoi, si l'on a à examiner une solu ion contenant

[1]) Zeitschr. für anorg. Chemie, **53**, 344 (1907).
[2]) Ces mêmes Comptes-rendus, **9**, 172.

de l'hydroxyde ou du bicarbonate, il convient d'y ajouter une dose d'acide chlorhydrique ou d'hydroxyde de sodium déterminée par un essai préliminaire et de ne procéder qu'ensuite au chauffage et à la précipitation au moyen du chlorure de baryum.

A. Dispositif expérimental.

Lorsqu'on titre des carbonates en employant une solution de baryte en présence de la phénolphtaléine, on ne peut pas dire d'avance si l'on doit choisir comme point terminal du titrage, le point où la liqueur se décolore ou celui où il apparaît une teinte légèrement rouge. Cela dépend des sels présents dans la solution et, d'autre part, de la quantité de solution indicatrice ajoutée. Mais si l'on prépare une liqueur de contrôle contenant justement les mêmes sels dans une même concentration et aussi la même proportion de réactif indicateur que la liqueur à titrer à la fin de la titration, il est facile de comprendre que cette liqueur de contrôle secouée avec du carbonate de baryum doit acquérir la teinte qui dans les conditions actuelles correspond justement au point neutre réel que possède le carbonate de baryum, et c'est jusqu'à cette intensité de couleur qu'il faut titrer toutes les analyses considérées.

Etant donné cependant, que cette intensité est sous la dépendance de la proportion présente des sels, d'un côté, et, de l'autre, de la quantité d'indicateur, il faut nécessairement, pour provoquer la couleur la mieux appropriée à la titration, tenir compte de ces facteurs, ce qui est facile à faire.

Dans un travail antérieur[1]) nous avons signalé que l'eau pure secouée avec du carbonate de baryum accusera une réaction nettement alcaline vis-à-vis de la phénolphtaléine, et qu'une addition de chlorure de baryum (3^{gr},7 à 100 cc. de liqueur) empêche cette réaction de se produire. La présence de chlorure de sodium (1^{gr},1 par 100 cc. de solution) tend à renforcer la réaction alcaline du carbonate barytique, ainsi qu'on devait s'y attendre; mais dans ce cas aussi l'addition ci-dessus mentionnée de chlorure de baryum a pour effet de ramener la réaction neutre. Dans ces essais antérieurs nous avons employé 5 gouttes de solution

[1]) Voir ces mêmes Comptes-rendus **9**, 147.

de phenolphtaleine $^1/_2$ gr. de phénolphtaléine dissous dans 50 cc. d'alcool + 50 cc. d'eau) pour 100 cc. de liqueur.

Nous avons refait ces essais, et nous avons trouvé ces données confirmés de point en point. Toutefois, si, comme nous l'avons fait dans la suite, on choisit une autre concentration des sels et une autre quantité de phénolphtaleine, ce que nous venons de dire ne s'applique évidemment qu'avec les modifications entraînées tout naturellement par les conditions modifiées.

Pour les essais que nous allons relater, nous nous sommes arranges de maniere a avoir toujours, à la fin de la titration, autant que possible le même volume de liqueur, la même proportion de chlorure de baryum, de chlorure de sodium ou de potassium, et bien entendu aussi de réactif indicateur; seule la proportion de carbonate barytique séparé était variable. Ce n'est que de cette façon qu'il est possible d'employer une même liqueur de contrôle pour tous les titrages et de comparer entre eux les différents essais.

M. le Blanc, dans ses essais, n'a ordinairement pas tenu compte de la concentration des chlorures alcalins; pour ce qui est de l'addition de chlorure de baryum, il la choisit de manière à ce qu'après la précipitation il y ait dans environ 100 cc. de liqueur 10 cc. environ de solution 2-normale de chlorure de baryum.

Afin de nous rapprocher, autant que possible, des conditions experimentales de le Blanc, nous avons toujours opéré avec un même excès de chlorure de baryum. De plus, nous avons trouvé bon de faire usage d'une liqueur de contrôle dont l'intensité de couleur était telle qu'on pouvait décider avec certitude non seulement si l'analyse avait une teinte rouge plus marquée, mais aussi si cette teinte était moins accusée que celle de la liqueur de contrôle. C'est pourquoi nous avons mis en œuvre une plus grande dose l'indicateur que dans nos essais antérieurs, a savoir 1 cc. de la solution de phénolphtaléine mentionnée ci-dessus pour 250 cc. de liqueur.

Les solutions suivantes utilisées pour nos essais ont toutes été préparées au moyen d'eau bouillie et débarrassée d'acide carbonique. Elles étaient conservées dans des bouteilles Woulff remplies d'air exempt d'acide carbonique et mu-

nies des dispositifs habituels permettant de remplir la burette sans accès à l'air extérieur chargé d'acide carbonique.

1° Une solution demi-normale de carbonate de sodium. 27gr,5 de carbonate sodique anhydre et pur (C. A. F. Kahlbaum) desséché d'après Lunge à 270° à 300°, furent dissous dans de l'eau, et la solution ainsi obtenue complétée à 1 l. Une détermination très exacte montra que la solution était 0,518-normale.

2° Solution environ demi-normale relativement au potassium de carbonate potassique renfermant du bicarbonate. 148 gr. de carbonate potassique pur (C. A. F. Kahlbaum) et 7 gr. de bicarbonate potassique (préparé par nous-mêmes) furent dissous dans de l'eau, et la solution complétée jusqu'à 4 l. Une détermination exacte fit voir que la liqueur relativement au potassium était 0,511-normale, et que, ainsi qu'on le verra plus loin, l'excès d'acide carbonique présent dans 160 cc. répondait à 30cc,05 de lessive normale au 1/10 de soude.

3° Solution 2-normale de chlorure de baryum préparée en dissolvant dans de l'eau 977 gr. de $BaCl_2, 2H_2O$ pur, puis complétant jusqu'à 4 l. La solution était parfaitement neutre.

4° Solution demi-normale environ de chlorure de potassium ou de sodium. Toutes ces solutions présentaient une réaction tout à fait neutre.

5° Acide chlorhydrique normal au 1/10 très exactement étalonné, et lessive de soude normale au 1/10 y correspondante.

6° Carbonate barytique pur préparé en précipitant, à chaud, du chlorure de baryum au moyen du carbonate de sodium, puis débarrassant le précipité de son chlore par lavage à l'eau chaude. On le conservait délayé dans un peu d'eau, et pour chaque liqueur de contrôle on employait 2 cc. de cette émulsion.

La liqueur de contrôle fut préparée au moyen de

25 cc. de solution 2-normale de chlorure de baryum,
160 cc. de solution n/2 de chlorure sodique ou potassique
65 cc. d'eau

250 cc.

On ajouta à cette liqueur 1 cc. de solution de phénolphtaléine et 2 cc. de l'émulsion de carbonate barytique, et on secoua bien le mélange ainsi obtenu.

Les analyses, vers la fin de la titration, présentaient toujours une composition analogue a celle de la liqueur de contrôle; seulement la quantité de carbonate de baryum séparée dans les divers essais était naturellement variable. Par exemple, dans une série d'essais où les précipitations étaient opérées avec un excès d'environ 2 cc. de lessive de soude normale au $^1/_{10}$, les quantités employées étaient les suivantes:

1° 160 cc. de solution $^n/_2$ de carbonate de potassium,
32 - - lessive de soude $^n/_{10}$,
65 - - solution 2-n. de chlorure de baryum.

257 cc.

2° 80 cc. de solution $^n/_2$ de carbonate de potassium,
80 - - — - - chlorure - —
17 - - lessive $^n/_{10}$ de soude,
45 - - solution 2-n. de chlorure de baryum.
28 - d'eau.

250 cc.

3° 40 cc. de solution $^n/_2$ de carbonate de potassium,
120 - - — - - chlorure - —
9cc,5 - lessive $^n/_{10}$ de soude,
35 cc. - solution 2-n. de chlorure de baryum,
45cc,5 d'eau.

250 cc.

4° 20 cc. de solution $^n/_2$ de carbonate de potassium,
140 - - — - - chlorure - —
5cc,5 - lessive $^n/_{10}$ de soude,
30 cc. - solution 2-n. de chlorure de baryum,
54cc,5 d'eau.

250 cc.

5° 10 cc. de solution $^n/_2$ de carbonate de potassium,
150 - - — - - chlorure - —
4 - - lessive $^n/_{10}$ de soude,
27 - - solution 2-n. de chlorure de baryum,
59 - d'eau.

250 cc.[1]

[1]) Ce n'est que dans une seule série d'essais — où la précipitation était opérée par un excès d'environ 40 cc. de lessive de soude normale au $^1/_{10}$ — que

Dans ce qui va suivre, nous indiquerons seulement combien on mettait en œuvre pour chaque essai de la solution de carbonate sodique ou potassique; quant aux quantites des autres liqueurs, on les verra aisément par les exemples donnés.

Afin d'éclaircir la question de plus près, nous allons donner la description détaillée d'une de nos analyses.

Dans un matras d'une capacité de $^3/_4$ l. et rempli d'air exempt d'acide carbonique[1]), on mesura

80 cc. de solution $^n/_2$ de carbonate de potassium
80 - - — - - chlorure - —
17 - - lessive $^n/_{10}$ de soude
28 - d'eau

puis on chauffa ce mélange pendant 10 minutes au bain d'eau bouillante, en faisant passer par le matras, mais non par la liqueur, un très faible courant d'air débarrassé d'acide carbonique. 45 cc. de solution 2-normale de chlorure de baryum mesurés dans une petite fiole en verre d'Iéna, puis également chauffés pendant 10 minutes au bain d'eau bouillante, furent alors ajoutés rapidement à la solution chaude de carbonate, après quoi on fit refroidir lentement le matras en augmentant quelque peu le courant d'air. C'est alors qu'on prépara la liqueur de contrôle et qu'on ajouta 1 cc. de solution de phénolphtaléine à l'analyse, qui prit une teinte fortement rouge, et qu'on titra ensuite jusqu'à l'intensité de couleur de la liqueur de contrôle.

Après avoir ajouté avec précaution, en tout, 2 cc,20 d'acide chlorhydrique normal au $^1/_{10}$ (ayant soin après chaque addition de fermer le matras par un bouchon en caoutchouc et de le secouer très soigneusement), on pouvait remarquer que l'analyse, même après un quart d'heure de repos, était d'un rouge plus faible que la liqueur de contrôle. Une comparaison sûre ne peut être faite qu'après un temps de repos, car ce n'est qu'après ce laps de temps que le dépôt s'est réuni au fond. Alors on ajouta deux gouttes de lessive de soude normale au $^1/_{10}$ et l'on secoua bien, puis après un délai d'un quart d'heure on compara à nou-

le volume de la liqueur après la titration était de 300 cc. environ; mais dans ce cas on se servait d'une liqueur de contrôle étendue en conséquence.

[1]) Tous les matras employés étaient en verre d'Iéna, et avant de s'en servir on les chauffait pendant vingt-quatre heures au bain-marie bouillant, d'abord avec de l'eau alcaline et ensuite avec de l'eau pure.

veau l'intensité de couleur. La couleur de la liqueur de contrôle était encore d'un rouge sensiblement plus fort que celle de l'analyse. Après avoir ajouté de nouveau deux gouttes de lessive de soude normale au $^1/_{10}$, puis secoué *etc.*, il n'y avait plus de différence sensible dans l'intensité de couleur des deux liquides, et une nouvelle addition de deux gouttes de lessive rendit la teinte rouge de l'analyse sensiblement plus marquée que celle de la solution de contrôle.

Ainsi, à la suite de ces opérations, les 80 cc. de carbonate potassique renfermant du bicarbonate contenaient, au delà du carbonate normal, une proportion d'acide carbonique équivalente à 15 cc. de lessive de soude normale au $^1/_{10}$:

17 cc. + 4 gouttes..... = 17 cc,2 de lessive de soude $^n/_{10}$
÷ 2 cc,20 d'acide chlorhydrique $^n/_{10}$ = 2 cc,2 - — - — -

Différence 15 cc,00 de lessive de soude $^n/_{10}$

Voilà la manière dont tous nos essais ont été faits, à moins d'indications contraires.

B. Essais sur le carbonate de sodium desséché d'après Lunge. Les solutions de carbonates alcalins de le Blanc ont-elles été exemptes de bicarbonate?

A la question soulevée dans ce mémoire: «Une solution de carbonates alcalins purs donne-t-elle par l'addition d'une solution neutre de chlorure de baryum un liquide acide, neutre ou alcalin?» la réponse était facile à donner, s'il était possible de préparer un carbonate alcalin réellement pur, c'est-à-dire exempt d'hydroxyde et de bicarbonate comme aussi d'autres impuretés, et si l'on était a même d'en démontrer la pureté d'une manière irréfutable.

Les méthodes analytiques usuelles ne sont cependant pas suffisantes pour mettre en évidence des doses d'hydroxyde ou de bicarbonate si minimes que celles dont il est question ici; mais nous croyons pouvoir affirmer que les travaux de G. Lunge et de J. Sebelien cités au début du présent mémoire, ainsi que nos propres recherches, ont établi à n'en plus douter, que l'oxalate de sodium (d'après Sørensen) et le carbonate de sodium (desséché d'après Lunge) donnent le même résultat dans l'éta-

lonnage d'un acide. Si maintenant on se rappelle que la pureté de l'oxalate de sodium peut être vérifiée facilement et avec certitude, il parait qu'on est en droit de tirer la conclusion que le carbonate de sodium (séché d'après Lunge) est pur, ou en tout cas qu'il renferme, tout au plus, des proportions d'impuretés si minimes, qu'on ne peut pas les déceler par les ressources actuellement à notre disposition.

En partant de ce point de vue, nous avons résolu de rechercher comment une solution de carbonate sodique séché d'après Lunge (voir p. 187) se comporte, si on la fait précipiter au moyen de chlorure de baryum.

Les essais n°s 1 et 2 furent exécutés tous les deux exactement comme il a été décrit plus haut; pour chacun de ces essais on mit en œuvre 160 cc. de la solution demi-normale de carbonate de sodium, sans addition de lessive de soude.

Dans ces deux essais la liqueur accusait une couleur nettement rouge, bien qu'un peu plus faible que celle de la liqueur de contrôle. Après addition de 2 gouttes de solution de soude normale au $^1/_{10}$ à chacune, les deux solutions acquirent une intensité de la couleur rouge beaucoup plus forte que celle de la liqueur de contrôle.

Dans ces essais il s'agit donc de quantités d'acide carbonique si insignifiantes, qu'elles répondent, tout au plus, à une goutte de lessive de soude normale au $^1/_{10}$, et que, par conséquent, elles ne dépassent point les limites des erreurs expérimentales.

Les essais n°s 3 et 4 furent effectués avec la même quantité de carbonate sodique et de la même manière, à ceci près, qu'avant la précipitation on a ajouté dans chaque essai 2 cc. de lessive de soude normale au $^1/_{10}$.

Pour la titration

l'essai n° 3 a exigé 2^cc^,0 d'acide chlorhydrique n. au $^1/_{10}$
— 4 — 1^cc^,9 — — — — —

Dans les essais n°s 5 et 6 on a également mis en œuvre 160 cc. de la solution de carbonate sodique sans addition de lessive de soude; toutefois la précipitation au chlorure de baryum a été effectuée à la température ordinaire.

Ces deux essais ont donné des liqueurs fortement rouges. Ce n'est qu'après addition de 0^cc^,65 d'acide chlorhydrique normal

au $^1/_{10}$ à chacune qu'elles ont pris la coloration de contrôle. Après addition de 0cc,8 d'acide chlorhydrique normal au $^1/_{10}$, elles accusaient encore une teinte rougeâtre et ne sont devenues parfaitement incolores qu'après une addition à chacune d'elles de 1 cc. d'acide, en tout.

On a ajouté alors à chacune 1 cc. de lessive de soude normale au $^1/_{10}$ correspondant à l'acide chlorhydrique ajouté), et ensuite on les a chauffées comme d'habitude pendant dix minutes au bain d'eau bouillante. Après refroidissement, l'intensité de couleur dans l'un et l'autre essai était la même que celle de la liqueur de contrôle. Afin de contrôler plus exactement, on ajouta alors 2 gouttes de lessive de soude normale au $^1/_{10}$ au n° 5, ce qui en rendit la teinte beaucoup plus forte que celle de la liqueur de contrôle, et 2 gouttes d'acide chlorhydrique normale au $^1/_{10}$ ajoutées au n° 6 donnèrent à cette dernière liqueur une teinte beaucoup plus faible que celle de la liqueur de contrôle.

Ces essais démontrent qu'une solution de carbonate sodique pur donne une liqueur franchement alcaline, si on la précipite à la température ordinaire au moyen de chlorure de baryum, alors qu'en précipitant à chaud on obtient une solution absolument neutre.

Comment M. le Blanc a-t-il pu s'assurer que les solutions de carbonates alcalins employées par lui étaient bien pures et surtout exemptes de bicarbonates? Tout d'abord il avait préparé les solutions au moyen du sel commercial le plus pur *(pro analysi* de Merck[1]; mais il est évident que cela ne fournit point de sûreté au point de vue qui nous occupe. Puis M. le Blanc a soumis la solution de carbonate potassique à l'épreuve suivante[2]):

„100 cm^3 0.1 n Kaliumkarbonatlösung wurden bei Zimmertemperatur mit einem kohlensäurefreien Luftstrom 3 Stunden lang behandelt. In einer vorgelegten Barytlösung von bekanntem Gehalt war keine Trübung nachzuweisen. Sodann wurde die Lösung mit 25 cm^3 2 n $BaCl_2$ versetzt und wiederum Luft durchgeleitet. Schon nach 20 Minuten machte sich jetzt eine deutliche Trübung bemerkbar; nach zwei Stunden ergab sich bei der

[1]) Le Blanc et Novotny: Zeitschr. für anorg. Chemie, **51**, 187 (1906).
[2]) Zeitschr. für anorg. Chemie, **53**, 346 (1907).

Titration, dass 0.42 cm^3 der 0.1 n Barytlösung verbraucht worden waren. Die saure Reaktion der Lösung ist also erst durch den Zusatz von $BaCl_2$, beziehungsweise durch den Karbonatniederschlag entstanden.

Eine Wiederholung des Versuches ergab den Verbrauch von 0.70 cm^3 Baryumhydroxydlösung. In beiden Fällen war die im Kolben zurückgebliebene Flüssigkeit ganz neutral geworden, schon mit den ersten Tropfen einer Baryumhydroxydlösung wurde Rot färbung des Phenolphtaleins hervorgerufen.»

Nous n'ignorons pas que les belles recherches de F. W. Küster et Max Grüter[1]) ont démontré que des solutions de carbonates sodiques même assez fortement alcalines, traversées par de l'air exempt d'acide carbonique, sont susceptibles de céder de l'acide carbonique quand la température se rapproche du point d'ébullition. Or, ces mêmes savants ont signalé aussi que, a 25° ou même à 50°, les solutions de carbonate sodique pur ne cèdent que des proportions négligeables d'acide carbonique, même si on les fait traverser pendant plusieurs jours par de l'air débarrassé d'acide carbonique. Nous ressouvenant en même temps de ce fait, connu depuis longtemps[2]), à savoir qu'il est très difficile d'éliminer d'une solution de carbonates toute trace d'acide carbonique excédant, il nous parut indiqué de vérifier par des essais la valeur de la méthode analytique de le Blanc.

Essai: Dans un matras rempli de 200 cc. d'eau bouillie, on fit passer pendant une heure un courant d'air débarrassé de son acide carbonique, courant qu'on dirigea ensuite dans une solution de baryte. La limpidité de cette dernière en fut à peine troublée. On ajouta alors à l'eau 1 gr. de carbonate de sodium séché d'après Lunge, et l'on continua le courant d'air encore pendant une heure sans que la solution barytique en devînt plus trouble.

En ajoutant alors $0^{gr},01$ de bicarbonate sodique pur, puis continuant le courant d'air durant deux heures encore, on ne put non plus constater de dégagement d'acide carbonique. On obtint le même résultat négatif en ajoutant ultérieurement

$0^{gr},04$	$NaHCO_3$	et	maintenant	le	courant	d'air	pendant	5	heures
$0^{gr},05$	—	-	—	-	—	—	—	11	—
$0^{gr},15$	—	-	—	-	—	—	—	3	—

La quantité totale de bicarbonate sodique ajoutée à la solution de 1 gr. de carbonate sodique, était donc de $0^{gr},25$, et néanmoins les proportions d'acide carbonique chassées par un courant d'air

[1]) Ber. der d. chem. Ges., **36**, 748 (1903).

[2]) Voir par ex. H. Rose: Annalen der Physik und Chemie, **34**, 149 (1835).

pendant plusieurs heures etaient tout à fait insignifiantes[1]); d'ailleurs celles-ci peuvent tres bien s'être introduites lors des ouvertures répétées du matras.

Apres avoir renouvelé la solution de baryte, on ajouta à la solution des carbonates 35 cc. de solution 2-n. de chlorure de baryum, puis on fit passer lentement un courant d'air jusqu'au lendemain. Apres un quart d'heure déjà, on pouvait facilement remarquer un dépôt dans la solution barytique, et le lendemain une titration de l'eau de baryte fit constater une teneur en acide carbonique correspondant à 14cc,25 d'eau barytique normale au 1/5 (D'après la dose de bicarbonate sodique — qui d'ailleurs n'avait pas été pesée très minutieusement —, on peut calculer 14cc,88 de baryte normale au 1/5).

Il appert de ces essais qu'une teneur possible de bicarbonate dans une solution de carbonates ne se laisse pas déceler par le procédé de le Blanc.

Immédiatement après l'épreuve dont il a été question ci-dessus, le Blanc décrit deux expériences dans lesquelles la précipitation de la solution de carbonate au moyen du chlorure de baryum était opérée à chaud parce que «es nicht ausgeschlossen erschien, dass sich die durch Fällung mitgerissene Menge von basischem Salz verringern liesse, falls die Fällung in der Wärme vorgenommen wurde». Mais le résultat de ces expériences ne fut pas celui que le Blanc en attendait; il fut au contraire tout l'opposé: loin de dégager une quantité moindre d'acide carbonique, la précipitation à chaud en mit en liberté une proportion plus forte. Ce résultat est facile à comprendre, si l'on se souvient qu'a chaud il ne se précipite que du carbonate normal, alors qu'a froid un peu d'acide carbonique se trouve entraîné en même temps, ainsi que nous l'avons vu plus haut.

Il nous reste encore à mentionner que, comme preuve de l'absence de bicarbonate, le Blanc cite que «es dann zu erwarten wäre, dass der Fehler proportional der verwendeten Karbonatmenge zunähme, was ja nicht der Fall ist». A cela nous répondrons que dans les cas où l'on emploie dans les différents essais des quantités très inégales de carbonate, il est particulierement nécessaire de titrer jusqu'au vrai point neutre, en employant pour la comparaison une liqueur de contrôle appropriée, attendu qu'une consommation de 0cc,1 en plus de lessive de soude normale au 1/10 signifie beaucoup plus quand on ne met en œuvre que 0cc,2 en tout, que lorsqu'on en emploie 10 fois plus.

[1]) En titrant l'eau de baryte, on trouva une quantité d'acide carbonique correspondant à 0cc,3 de solution normale au 1/5 de baryte.

D'ailleurs, on n'a guère lieu de s'attendre à une pareille proportionnalité, si la précipitation ne suit pas un cours normal. Si, au contraire, le Blanc avait précipité sa solution de carbonate renfermant du bicarbonate comme elle devait l'être (c'est-à-dire, après addition d'une dose convenable de lessive de soude et à chaud) et s'il avait titré jusqu'au point neutre exact, il n'aurait pas manqué de trouver la proportionnalité entre la quantité de carbonate qu'il mettait en œuvre et, de l'autre côté, l'excès présent d'acide carbonique. Dans le chapitre suivant nous allons parler d'une manière plus détaillée de quelques essais que nous avons entrepris dans ce sens.

C. Essais faits avec une solution de carbonate potassique renfermant du bicarbonate.

Ces essais ont porté sur la solution de carbonate potassique indiquée plus haut (voir p. 187); si nous avons choisi un excès assez considérable d'acide carbonique (répondant à 30^{cc},05 de lessive de soude normale au $^1/_{10}$ dans 160 cc. de la solution, c'est afin de pouvoir mettre en évidence au moyen de chiffres relativement grands et même pour de fortes dilutions de la solution de carbonate, la proportionnalité signalée à la fin du précédent chapitre.

Après avoir établi au moyen d'un essai préalable que l'excès d'acide carbonique des 160 cc. de solution de carbonate répondait à 30 cc. environ de lessive de soude normale au $^1/_{10}$, nous avons effectué quelques expériences dans lesquelles la précipitation était opérée à chaud en milieu très faiblement alcalin, nous basant pour cela sur les résultats que nous avaient donnés nos essais sur la solution de carbonate sodique normal. En opérant ainsi, nous avions pour but de déterminer avec précision l'excès d'acide carbonique aussi bien que les sources d'erreur du procédé utilisé.

Pour chaque essai nous avons mis en œuvre

160 cc. de la solution de carbonate
30 ^{cc},30 de lessive de soude normale au $^1/_{10}$ et
65 cc. de solution 2-n. de chlorure barytique.

Dans divers essais l'excès d'acide carbonique dans 160 cc. de la solution de carbonate s'est trouvé répondre aux nombres suivants de centimètres cubes de lessive normale au $^1/_{10}$:

30,15 — 30,00 — 30,05 — 30,10 — 30,05 — 30,05 — 30,15 — 30,05 — 29,95 — 30,00 — 29,95.

En moyenne, 30cc,05 de lessive de soude normale au $^1/_{10}$; le plus grand écart d'avec la moyenne est de 0cc,1 de lessive de soude normale au $^1/_{10}$.

Nous procédâmes ensuite à deux séries d'expériences portant sur différentes quantités de solution de carbonate potassique telles que les normalités des liqueurs relativement audit carbonate fussent les suivantes:

0,33 — 0,16 — 0,08 — 0,04 et 0,02.

Dans les expériences de la première série on n'ajoutait préalablement qu'une dose de lessive de soude correspondant à l'excès d'acide carbonique, tandis que dans celles de la seconde série on ajoutait, en plus, 2 cc. de lessive de soude normale au $^1/_{10}$[1]. La précipitation fut effectuée à froid, et ensuite on procéda à la titration. Ainsi qu'on le verra par le tableau VII ci-dessous, tous ces titrages ont donné une trop petite teneur en acide carbonique dans les solutions de carbonates potassiques considérées. On voit donc, qu'il a été précipité un sel acide dans tous ces essais et, comme on pouvait s'y attendre, surtout dans ceux où on n'avait ajouté préalablement que la quantité de lessive de soude correspondant à l'excès d'acide carbonique.

En comparant entre elles les différences consignées dans la colonne 6, on voit qu'il n'est pas question d'une véritable proportionnalité. Après addition des doses d'hydroxyde sodique exprimées par ces différences — et qui répondaient, par conséquent, à la proportion de sel acide entraînée —, on chauffa les liqueurs pendant dix minutes au bain d'eau bouillante, comme à l'ordinaire; puis, après refroidissement, on les titra à nouveau de la façon habituelle à l'aide d'une liqueur de contrôle récemment préparée. Le tableau I montre que cette seconde titration a donné les valeurs justes, réellement proportionnelles, puisque les différences (colonne 7) varient d'une façon irrégulière et restent dans les limites d'erreurs (0cc,1).

[1]) Ce sont les doses de cette dernière série que nous avons données comme exemples plus haut (voir p. 188).

Tableau VII.

Solution de carbonate potassique mise en œuvre	Préalablement additionnée de — cc. de lessive de soude normale au $^1/_{10}$	— cc. de lessive de soude norm. au $^1/_{10}$ correspondant à l'excès d'acide carbonique dans le volume examiné de solution de carbonate potassique			Différence a—b (Titrage après précipitation à froid)	Différence a—c (Titration après chauffage).
		Calculé	Trouvé après précipitation à froid	Trouvé après chauffage		
cc	cc	a	b	c		
160	30,05	30,05	29,25	30,00	+ 0,80	+ 0.05
80	15,00	15,03	14,55	15,05	+ 0,48	÷ 0,02
40	7,50	7,51	7,15	7,50	+ 0,36	+ 0,01
20	3,75	3,76	3,55	3,80	+ 0,21	÷ 0.04
10	1,90	1,88	1,75	1,85	+ 0,13	+ 0,03
160	32,00	30,05	29,75	30,00	+ 0,30	+ 0,05
80	17,00	15,03	14,90	15,05	+ 0,13	÷ 0,02
40	9,50	7,51	7,35	7,60	+ 0,16	÷ 0,09
20	5,50	3,76	3,65	3,80	+ 0,11	÷ 0,04
10	4,00	1,88	1,75	1,95	+ 0,13	÷ 0,07

Enfin on effectua trois séries d'expériences dont nous avons réuni les résultats dans le tableau VIII. Dans ces essais on opéra la précipitation toujours à chaud, mais à des degrés d'alcalinité différents. En sus de la quantité de lessive de soude répondant à l'excès d'acide carbonique, on ajouta dans chaque essai :

dans la première série un excès d'env. 2 cc. de lessive norm. au $^1/_{10}$
— - deuxième — - — — 10 - - — — —
— - troisième — - — — 40 - - — — —

Les titrages ayant été faits de la manière souvent mentionnée, on a remis les analyses pendant dix minutes au bain d'eau bouillante, et ensuite, après refroidissement, on les a titrées à nouveau. Cette suite d'opérations a été réitérée encore une fois pour la troisième série d'essais.

Il ressort du tableau VIII que seule la précipitation en milieu faiblement alcalin a donné des valeurs justes. Déjà un excès de 10 cc., et à plus forte raison encore, un excès de 40 cc. de lessive de soude normale au $^1/_{10}$, fait précipiter du sel basique. Il est vrai que, le grand excès d'alcali ayant été neutralisé lors

Tableau VIII.

Solution de carbonate potassique mise en œuvre	Préalablement additionnée de — cc. de lessive de soude norm. au $^n/_{10}$	— cc. de lessive de soude norm. au $^1/_{10}$ correspondant à l'excès dans le volume examiné de solution de carbonate potassique				Différence a — b (Titrage après précipitation à chaud)	Différence a — c (Titrage après rechauffage)	Différence a — d (Titrage après 2 chauffages)
		Calculé	Trouvé par le premier titrage (précipitation à chaud)	Trouvé par le 2e titrage (après rechauffage)	Trouvé par le 3e titrage (après un 2e chauffage)			
cc.	cc.	a	b	c	d			
160	32,00	30,05	30,10	30,10	—	÷ 0,05	÷ 0,05	—
80	17,00	15,03	15,00	15,05	—	+ 0,03	÷ 0,02	—
40	9,50	7,51	7,60	7,60	—	÷ 0,09	÷ 0,09	—
20	5,50	3,76	3,70	3,75	—	+ 0,06	+ 0,01	—
10	4,00	1,88	1,90	1,95	—	÷ 0,02	÷ 0,07	—
160	40,00	30,05	30,60	30,35	—	÷ 0,55	÷ 0,30	—
80	25,00	15,03	15,15	15,10	—	÷ 0,12	÷ 0,07	—
40	18,00	7,51	7,60	7,65	—	÷ 0,09	÷ 0,14	—
20	14,00	3,76	3,90	3,95	—	÷ 0,14	÷ 0,19	—
10	12,00	1,88	2,10	2,15	—	÷ 0,22	÷ 0,27	—
160	70,00	30,05	31,65	30,90	30,85	÷ 1,60	÷ 0,85	÷ 0,80
80	55,00	15,03	16,10	15,70	15,65	÷ 1,07	÷ 0,67	÷ 0,62
40	48,00	7,51	8,30	7,95	7,95	÷ 0,79	÷ 0,44	÷ 0,44
20	44,00	3,76	4,35	4,25	4,25	÷ 0,59	÷ 0,49	÷ 0,49
10	42,00	1,88	2,30	2,25	2,30	÷ 0,42	÷ 0,37	÷ 0,42

de la première titration, un chauffage subséquent peut porter remede dans une certaine mesure; mais nous n'avons pas réussi à effectuer de la sorte une décomposition complète du sel basique.

Ainsi donc, à la température ordinaire, une solution de carbonate alcalin normal donne lieu à la précipitation d'un sel acide, et a chaud dans une solution alcaline il se précipite du sel basique. C'est pourquoi il semble que pour une température quelconque on pourrait bien trouver une alcalinité convenable permettant de faire precipiter précisément le sel normal; mais nous n'avons pas donné suite à cette pensée parce qu'elle est sans conséquence pratique pour la titration d'après Winkler.

En terminant, nous tenons à faire remarquer encore ce qui suit:

Pour qu'une titration suivant le procédé de Winkler puisse fournir un résultat parfaitement exact, il faut l'opérer à chaud et en milieu très faiblement alcalin. Si la solution considérée renferme du bicarbonate ou de l'hydroxyde, il convient d'en déterminer d'abord approximativement la proportion au moyen d'un essai préalable, et puis, avant d'effectuer la titration finale, il faut ajouter une dose convenable de soude ou d'acide chlorhydrique.

Novembre 1907.

SUR LA CONCENTRATION OPTIMALE DES IONS HYDROGÈNE POUR LA PREMIÈRE PHASE DE LA DÉCOMPOSITION TRYPSIQUE DE LA GÉLATINE. («LIQUÉFACTION DE LA GÉLATINE»).

PAR

SVEN PALITZSCH ET L. E. WALBUM.

1. Introduction.

POUR une série de recherches comparatives sur l'action protéolytique de divers liquides, nous nous sommes servis de la méthode de gélatine de Fermi sous la forme utilisée depuis plusieurs années par Th. Madsen et L. E. Walbum dans l'Institut de sérum de l'Etat danois, à Copenhague, pour une suite d'expériences qui n'ont été publiées que partiellement[1]). Cependant, nos premiers essais effectués par ce procédé — dont nous ferons la description plus loin — sur l'influence exercée par la concentration en ions hydrogène sur la décomposition trypsique de la gélatine, nous ont conduits à ce résultat tout à fait inattendu que l'action protéolytique qui se traduisait par une diminution de la faculté de se gélifier de la gélatine, se montrait d'autant plus énergique que le liquide expérimenté était plus alcalin. Etant donné que dans cette réaction — que, pour abréger, nous appellerons *liquéfaction* de la gélatine — il se produit sûrement une décomposition enzymatique, le résultat auquel nous étions arrivés devait probablement provenir d'erreurs inhérentes à la méthode employée.

Vu que la méthode de Fermi s'est ordinairement montrée parfaitement utilisable — surtout lorsqu'il s'agit de démontrer la présence ou de faire le dosage de quantités minimes de protéases —, vu aussi que cette méthode trouve une application éten-

[1]) Voir Arrhenius, Immunochemie, p. 46 et suiv. (1907).

due pour les recherches cliniques et bactériologiques, il est tout naturel que nous nous soyons proposés de découvrir et de rectifier les sources d'erreurs dont elle pouvait être entachée, et pour arriver à ces fins nous avons entrepris une série d'essais pour lesquels comme enzyme protéolytique nous nous sommes servis de la «Pancréatine, Rhenania». Bien que nous n'ayons pas réussi à expliquer les nombreux phénomènes assez singuliers que présente la liquéfaction de la gélatine, nous croyons avoir établi que le défaut susmentionné dont la méthode est entachée tient principalement à ce fait que la faculté de se gélifier de la gélatine dépend, ou en tout cas peut dépendre, de la concentration en ions hydrogène du milieu. Par conséquent, ce défaut peut être facilement rectifié: pour cela il suffit d'avoir soin, au moyen d'une «neutralisation» convenable, de déterminer toujours la faculté de gélification de tous les échantillons d'une même série expérimentale à une même concentration ionique.

Lorsqu'il s'agit de rechercher l'influence exercée par la concentration des ions hydrogène sur la scission protéolytique en question, il est nécessaire, comme nous le ferons voir plus loin, d'apporter encore une modification à la méthode, à savoir, en ajoutant un «tampon» approprié à l'effet de maintenir constante la concentration ionique des divers liquides.

C'est à l'aide de la méthode ainsi modifiée que, pour les différentes températures, nous avons déterminé la concentration ionique optimale de la liquéfaction trypsique de la gélatine et, d'accord avec les idées de S. P. L. Sørensen[1]), d'un côté, et, de l'autre, avec les essais récemment publiés par J. Boselli[2]) sur l'action de l'inulase, nous avons pu démontrer une dépendance très marquée entre la température et la concentration optimale en ions hydrogène, en ce sens que cette dernière, qui à la température de 30^0 est de $10^{-9,9}$ environ, se trouve de plus en plus déplacée vers le point neutre à mesure que la température monte, si bien qu'à 55^0 elle arrive aux environs de 10^{-8}.

Alors que jusqu'ici il n'a pas été publié de déterminations de la concentration en ions hydrogène optimale pour la scission trypsique de la gélatine, on trouve dans la littérature chimique quelques indications relatives à la décomposition protéolytique

[1]) Ces mêmes Comptes-rendus, **8**, 148 (1909); Ergebnisse der Physiologie, **12**, (1912).

[2]) Annales de l'Institut Pasteur, **25**, 695 (1911).

d'autres substances. C'est ainsi que pour la caséine et des protéases de bactéries (des Bac. prodigiosus et pyocyaneus), à une température comprise entre 37° et 38°, Kurt Meyer[1]) a trouvé l'optimum à une concentration des ions hydrogène de $10^{-7,2}$, et que pour la caséine et la trypsine de Grübler à la même température il indique une concentration d'environ 10^{-8}. L. Michaelis et H. Davidsohn[2]), ayant opéré sur la peptone de Riedel et la trypsine fournie par Rhenania, ont à 37° trouvé l'effet optimal à la concentration en ions hydrogène de 10^{-8}.

2. Description de la méthode employée.

A. Historique.

Fermi[3]), pour ses recherches sur les enzymes protéolytiques, fit usage de la gélatine à la place de la fibrine, qu'on avait jusque-là utilisée pour démontrer la présence de ces enzymes. Après avoir rempli de petites éprouvettes avec une solution chaude de gélatine à 5—10 % additionnée d'un peu de thymol ou de chloroforme, Fermi, après refroidissement, verse quelques centimètres cubes de solution enzymatique sur la gélatine gélifiée. Au bout de quelque temps, une partie de la gélatine s'est liquéfiée, pourvu que la solution enzymatique employée ait été à même de scinder la gélatine.

Ayant affaire à des recherches quantitatives, Fermi mesura la hauteur de la couche de gélatine liquéfiée. Cependant cette mesure est si peu exacte que, lorsqu'il s'agit de recherches tant soit peu précises, elle peut à peine exprimer utilement l'effet enzymatique. Le plus grand inconvénient sous ce rapport provient de ce que l'enzyme et la gélatine ne se touchent que par une surface, ce qui peut avoir pour effet que l'action de l'enzyme se trouve enrayée par la gélatine scindée, de même que par exemple des phénomènes de diffusion peuvent aussi intervenir. La plupart de ces erreurs peuvent être évitées en mélangeant la solution enzymatique avec la gélatine liquide et opérant les essais à une température suffisamment haute pour empêcher la gélatine de se gélifier. Après un certain délai, on fera refroidir le mélange et, à mesure que la gélatine aura subi une scission enzy-

[1]) Biochem. Zeitschrift, **32**, 275 et 276 (1911).
[2]) *Ibid.*, **36**, 280 (1911).
[3]) Archiv für Hygiene, **12**, 242 (1891), et **55**, 142 (1906).

matique, elle se prendra alors en gelée lentement ou pas du tout. Déjà dans ses premiers mémoires, Fermi indique cette modification comme se prêtant tout particulièrement a l'examen de particules solides renfermant des enzymes[1]), mais il n'en fait usage que pour quelques-uns de ses essais sur l'action des acides[2]) sur les protéases bactériennes[3]). Ce n'est que beaucoup plus tard — après que la gélatine liquide eut été employée par Duclaux, Malfitano, Madsen et Walbum, et plusieurs autres — que Fermi relève énergiquement les inconvénients que présente la gélatine liquide. C'est que Fermi se préoccupe avant tout de constater la présence de quantités d'enzyme tout à fait minimes, et en ce cas la gélatine solide est évidemment préférable puisque les minces traces d'enzyme peuvent alors se concentrer à la surface.

Sous sa forme modifiée, la méthode ne permet sans doute pas de mesurer la proportion de gélatine décomposée de la manière indiquée ci-dessus. Mais il n'en est pas moins facile de la rendre propre aux mesurages quantitatifs. Pour cela, on n'a simplement qu'à diluer à des degrés différents la solution enzymatique, pour examiner alors laquelle de ces dilutions est capable, dans un laps de temps donné, de justement faire disparaître la faculté de la gélatine de se gélifier. Ce degré de dilution constitue, en plus, une expression bien plus exacte du pouvoir de la solution enzymatique comparativement à la méthode primitive, attendu que la digestion est menée au même point dans le même temps, seulement avec des solutions d'enzyme plus ou moins diluées. C'est dans cette modification que Madsen et Walbum se sont servis de la méthode de Fermi, qui d'ailleurs, sous des modifications diverses, est largement utilisée dans les recherches d'ordre clinique et bactériologique.

B. Influence de divers facteurs sur la précision de la méthode.

Ainsi qu'il a été dit dans l'introduction à ce mémoire, nos essais préliminaires sur l'importance de la concentration des ions hydrogène pour la liquéfaction trypsique de la gélatine ont montré que ce sont les solutions de gélatine les plus alcalines qui le plus rapidement perdent la faculté de se gélifier. Quant à une

[1]) Archiv für Hygiene, **12**, 260 (1891).
[2]) *Ibid.*, **14**, 20 (1892.)
[3]) *Ibid.*, **53**, 173 (1906).

concentration ionique optimale, nous n'en avions pas pu constater. Or, il est évidemment peu probable qu'il n'en existe pas une, et il paraissait *a priori* évident qu'elle ne pouvait être située à une concentration des ions hydrogène plus basse que celles employées dans nos essais; conséquemment, sa non-existence apparente devait être attribuée à des défauts inhérents à la méthode que nous employions. Parmi les causes d'erreur possibles, nous en avons examiné quatre que nous allons traiter plus en détail.

1°. Dépendance du temps de solidification de la concentration des ions hydrogène. Dans les essais préliminaires susmentionnés la solidification de la gélatine après la digestion eut lieu en présence de la même concentration en ions hydrogène que celle qui existait au cours de celle-ci. Ainsi que nous le ferons voir plus loin (3 E, p. 229) par une série d'essais, une solution fortement alcaline de gélatine se gélifie plus lentement qu'une solution neutre[1]). Ceci aura pour effet que la solution la plus alcaline se maintiendra liquide pendant plus longtemps que les solutions moins alcalines, même si la décomposition de celle-là était si peu avancée qu'elle se gélifierait beaucoup plus vite, si la solidification avait eu lieu en présence d'une même concentration ionique dans tous les échantillons expérimentés. Ce défaut de la méthode peut être facilement supprimé en neutralisant tous les mélanges après la digestion et immédiatement avant le refroidissement. Une fois cette amélioration introduite, nous avons aussitôt trouvé un optimum bien marqué, ayant constaté que les solutions les plus alcalines ne perdaient alors leur faculté de se gélifier qu'après une très longue digestion.

Des essais ultérieurs montrèrent cependant que la présence d'acide borique, que pour d'autres motifs (voir p. 207) nous avions ajouté à la gélatine, avait pour effet de beaucoup diminuer la différence que présentaient entre elles, sous le rapport de la faculté de se gélifier, une solution alcaline et une solution neutre de gélatine; toutefois, il convient naturellement toujours que, au moment de la solidification, le degré de décomposition de la gélatine soit la seule variable dans une même série d'essais, et c'est pourquoi dans tou-

[1]) Presque toutes les recherches antérieures sur l'influence exercée par des substances ajoutées sur la faculté de gélification de la gélatine, ont porté sur des sels et non sur des acides ou des bases.

tes nos expériences principales tous les échantillons ont été neutralisés avant la solidification.

2°. Décomposition de la gélatine par des ions hydroxyle. Comme on le sait, la faculté de se gélifier de la gélatine se trouve notablement diminuée à la suite d'une ébullition prolongée, surtout en milieu alcalin ou acide[1]). Cette transformation, qui s'opère également, bien qu'à un degré moindre, à des températures plus basses, aura pour effet que, pour les solutions les plus alcalines, le temps de solidification sera plus long que celui qui correspond à la conversion que l'enzyme a fait subir à la gélatine, et l'optimum trouvé dans les essais sera situé à une concentration en ions hydrogène inférieure — en d'autres termes, à une alcalinité supérieure — à celle correspondant à l'action enzymatique optimale. Pourtant, dans les conditions de temps et de concentration ionique choisies pour nos expériences principales, l'effet produit ne sera pas assez fort pour fausser le résultat de nos mesurages. (Comp. les essais p. 230).

3°. Inactivité de la trypsine vis-à-vis de certaines protéines naturelles. La trypsine n'est capable qu'avec difficulté d'agir sur certaines protéines naturelles, telles que la sérumalbumine, le blanc d'œuf de poule et d'autres[2]). Une courte chauffe ou un contact peu prolongé avec des acides ou des bases suffit souvent pour transformer ces protéines au point qu'elles sont facilement décomposées par la trypsine. C'est pourquoi on se sentirait naturellement porté à admettre que la gélatine fraiche ne pouvait se décomposer par action enzymatique avant d'avoir subi pendant quelque temps l'action d'ions hydroxyle. Vu que cette dernière paraissait devoir augmenter en même temps qu'augmenterait la concentration en ions hydroxyle, il s'ensuit que les mélanges les plus alcalins seraient les premiers à subir l'influence

[1]) Voir par ex. l'étude approfondie de P. Schroeder dans la Zeitschrift für physik. Chemie, **45**, 75 (1903). Il est à noter, toutefois, que les expériences de ce chimiste montrent seulement que, en présence des corps ajoutés, la gélatine soumise à l'ébullition est décomposée à des degrés différents; quant à la question de savoir si la gélatine additionnée de diverses substances se gélifie après des délais différents, elle n'a pas été résolue par lui. Il ne ressort également pas de ses expériences si le temps de solidification est influencé par la concentration ionique. Au fait, les vitesses de solidification mesurées par Schroeder se rapportent à des gélatines scindées à des degrés très différents, donc à des corps différents.

[2]) Voir Abderhalden, Biochem. Handlexicon, **5**, 590 (1911), où se trouve une bibliographie des publications ayant trait à ce sujet.

de la trypsine et que, par conséquent, ils perdraient le plus rapidement la faculté de se gélifier, encore que l'action enzymatique se fasse sentir bien moins vite que dans les mélanges les moins alcalins, où la concentration moindre en ions hydroxyle n'arriverait que beaucoup plus tard à rendre la gélatine accessible à l'influence de la trypsine. A la vérité, de cette manière aussi on trouverait le point optimal déplacé vers le côté alcalin; mais cet inconvénient, s'il existait, pourrait être sinon supprimé, du moins diminué considérablement en employant une solution de gélatine qui, avant d'être additionnée de l'enzyme, aurait été décomposée par l'hydroxyde de sodium. Deux séries d'essais effectuées l'une avec de la gélatine fraîche, l'autre avec de la gélatine décomposée en 20 heures à la température de 37° par une lessive de soude 0,04-n., montraient à peu près la même concentration ionique optimale (v. les tableaux X et XI), de sorte qu'on ne peut guère admettre que la trypsine soit inactive vis-à-vis de la gélatine fraîche.

4°. Augmentation de la concentration des ions hydrogène au cours de la scission de la gélatine. Lorsque des substances protéiques sont scindées par des enzymes ou par des ions hydroxyle, on constate toujours une modification de leur pouvoir de fixer les bases[1]). Par conséquent, dans les solutions alcalines de protéines ces scissions auront pour effet de diminuer la concentration des ions hydroxyle et, partant, d'accroître la concentration des ions hydrogène.

Pour ce qui concerne la trypsine et la peptone Witte, cette modification de la concentration ionique a déjà été mentionnée par S. P. L. Sørensen dans ses «Études enzymatiques» I[2]). La modification dont s'accompagne la décomposition de la caséine et de la protamine par la trypsine, a été mesurée par T. Brailsford Robertson et C. L. A. Schmidt[3]), et tout récemment, la modification à laquelle donne lieu la scission trypsique de la gélatine a été déterminée au moyen de mesures électrométriques faites au cours d'une série d'essais au Laboratoire de Carlsberg.

A titre d'exemple, nous citerons les deux essais suivants:

En opérant à 30° la digestion d'un mélange de 40 cc. de gélatine à env. 7 %, 2 cc. de lessive de soude normale, 1cc,4 d'acide

[1]) S. P. L. Sørensen, Ergebnisse der Physiologie, **12** (1912).

[2]) Ces mêmes Comptes-rendus, **7**, 53 (1907); voir aussi *ibid.*, **8**, 60 (1909).

[3]) The Journal of Biological Chemistry, **5**, 31 (1908).

chlorhydrique normal, 4cc,6 d'eau et 2 cc. d'une solution à 1 % de trypsine[1]), on mesura la concentration en ions hydrogène par voie électrométrique en maintenant la même température de 30°.

Au bout de

0	20	30	40	50	60	70	80	90	120	150
minutes, on a trouvé p_H^+ égal à										
(9,30)	9,02	8,87	8,73	8,60	8,47	8,37	8,29	8,21	8,03	7,91.

Dans un mélange analogue[2]), qui au lieu de 1cc,4 d'acide chlorhydrique n'en contenait que 1cc,2, on a constaté que, au but de

0	10	20	30	40	50	60	70	100
minutes, p_H^+ égalait								
(9,80)	9,68	9,58	9,48	9,33	9,24	9,14	9,03	8,65.

Vu les fortes modifications que la concentration des ions hydrogène a ainsi subi pendant le cours de l'essai, la détermination de la concentration ionique optimale pouvait difficilement donner un résultat satisfaisant, et par suite il devint nécessaire d'ajouter un «tampon» capable de réagir contre ces modifications. Pour les concentrations en ions hydrogène voisines de 10^{-9}, concentration à laquelle l'action optimale de la trypsine paraissait devoir se produire, il a été démontré par S. P. L. Sørensen, que l'acide borique exerce une action de tampon très marquée. Afin de voir quelle serait dans ce cas la teneur en acide borique suffisante, on ajouta à un mélange analogue à ceux indiqués ci-dessus 0,2 molécule-gramme d'acide borique par litre; au bout d'une heure on put constater que p_H^+ n'avait varié que de 9,18 à 9,16, écart qui pour le travail en question n'a guère d'importance. D'accord avec ce résultat, nous n'avons utilisé pour les expériences principales que des solutions de gélatine contenant 0,2 molécule-gramme d'acide borique par litre.

3. Partie expérimentale.

A. Solutions utilisées.

En vue de pouvoir, dans toutes les déterminations, opérer sur une même concentration de gélatine et de trypsine, nous avons fait dissoudre ces substances, une fois pour toutes, en quantité suffisante pour tous les essais.

Solution de trypsine. Un mélange de 30 gr. de pan-

---

[1]) Ce mélange correspond au n° 6 du tableaux X.

[2]) » » » » 5 » » X.

creatine de Rhenania et env. 250 cc. d'eau distillée fut abandonne, en agitant fréquemment, à la température ordinaire du laboratoire pendant quelques heures, puis filtré à travers du papier; ensuite, en lavant le filtre, on porta le volume à 300 cc., on ajouta 10 cc. de toluène et. après des agitations, on conserva la solution dans la glacière. On vit se séparer lentement un dépôt volumineux, qui disparut lorsque cette solution à 10 % fut diluée à 2 % et que le toluène fut expulsé au moyen d'un courant d'hydrogène. Avant de prélever, à l'aide d'une pipette, la quantité de trypsine devant servir à l'expérience, on agita énergiquement de façon à répartir le dépôt formé dans toutes les parties de la liqueur et à avoir ainsi une même quantité de dépôt dans chaque prise. Une solution à 1 % fut préparée en étendant, soit, 1 cc. avec 9 cc. d'eau distillée, et cette solution ne tarda pas à devenir parfaitement limpide. Elle se trouva contenir $0^{mgr},87$ d'azote par centimètre cube. La plupart de nos essais de digestion ont porté sur des mélanges qui pour 50 cc. contenaient 2 cc. de trypsine à 1 %, de sorte que leur concentration en trypsine était de 0,4 ‰. Outre ces solutions-là, nous en avons examiné quelques-unes renfermant, respectivement, 0,2 et 0,1 ‰ de trypsine.

Pour la préparation de la solution de gélatine nous employâmes 1400 gr. de gélatine française. Après l'avoir délayée, puis dissoute dans environ 2 l. $^1/_2$ d'eau chaude distillée, on fit passer la liqueur très visqueuse par un tamis; après addition d'environ 2 gr. de thymol (à l'état d'une émulsion aqueuse) et de 25 cc. de lessive de soude env. 5-n., la solution accusa une réaction faiblement alcaline sur le papier de tournesol. Enfin la solution, complétée avec de l'eau chaude distillée jusqu'à 4000 cc., fut versée dans des fioles de 200 cc. de capacité qui, une fois bouchées, ont été conservées dans la glacière. 1 gr. de cette gélatine renfermait 45 mgr. d'azote (après dilution de 100 gr. à 625 cc., on a trouvé p_H^+ égal à 5,8).

Immédiatement avant d'utiliser la gélatine, on pesa 200 gr. de la solution à 35 % ainsi préparée, et l'on compléta jusqu'à 1000 cc. avec de l'eau distillée additionnée de $15^{gr},5$ d'acide borique pur. En vue des essais, 40 cc. de cette solution furent complétés ultérieurement jusqu'à 50 cc., de sorte que les liqueurs expérimentées ont contenu env. 60 gr. de gélatine et $12^{gr},4$ d'acide borique (0,2 mol.-gr.) par litre.

Dans le but d'obtenir les différentes concentrations en ions hydrogène voulues, on ajouta aux divers mélanges différentes doses de lessive de soude. Les liqueurs sur lesquelles ont porté les essais consignés dans les tableaux III—IX avaient été préparées avec 40 cc. de la solution susmentionnée de gélatine additionnée d'acide borique, 2 cc. d'une solution de trypsine et les 8 cc. de lessive de soude indiqués ci-dessous.

(1 cc. d'un pareil mélange contenait $7^{mgr},25$ d'azote).

N°	1	$4^{cc},0$	de	lessive	de	soude	0,2 n	+ $4^{cc},0$	d'eau
»	2	$7^{cc},0$	»	»	»	»	0,2 n	+ $1^{cc},0$	»
»	3	$4^{cc},0$	»	»	»	»	1 n	+ $4^{cc},0$	»
»	4	$6^{cc},0$	»	»	»	»	1 n	+ $2^{cc},0$	»
»	5	$8^{cc},0$	»	»	»	»	1 n	+ $0^{cc},0$	»
»	6	$5^{cc},0$	»	»	»	»	2 n	+ $3^{cc},0$	»
»	7	$3^{cc},5$	»	»	»	»	2 n	+ $2^{cc},5$	»
»	8	$6^{cc},0$	»	»	»	»	2 n	+ $2^{cc},0$	»

Nous n'avons pas employé de solution plus acide que le n° 1 ($p_H^+ =$ ca. 7,3) parce qu'alors l'acide borique n'agit plus comme tampon et que, par suite, la concentration ionique serait susceptible de trop changer pendant le cours de l'essai.

Les mélanges de neutralisation, dont nous avons utilisé 1 cc. pour 5 cc. de solution de gélatine, contenaient une quantité d'acide chlorhydrique suffisante pour donner aux liquides expérimentés une réaction neutre vis-à-vis du papier de tournesol[1]).

Les mélanges indiqués aux tableaux X et XI se composaient de 40 cc. de solution à env. 7 % de gélatine et exempte d'acide borique, 2 cc. de solution à 1 % de trypsine, 2 cc. de lessive de soude normale (y compris la dose qui lors du traitement préparatoire avait été ajoutée à la gélatine du tableau XI avant l'addition de la trypsine), avec les proportions suivantes d'acide chlorhydrique et d'eau:

N°	1	$0^{cc},0$	d'acide	chlorhydrique	n/1	+ $6^{cc},0$	d'eau
»	2	$0^{cc},4$	»	»		+ $5^{cc},6$	»
»	3	$0^{cc},8$	»	»		+ $5^{cc},2$	»
»	4	$1^{cc},0$	»	»		+ $5^{cc},0$	»
»	5	$1^{cc},2$	»	»		+ $4^{cc},8$	»
»	6	$1^{cc},4$	»	»		+ $4^{cc},6$	»
»	7	$1^{cc},6$	»	»		+ $4^{cc},4$	»
»	8	$1^{cc},8$	»	»		+ $4^{cc},2$	»
»	9	$2^{cc},0$	»	»		+ $4^{cc},0$	»

[1]) La teneur en chlorure de sodium des solutions de gélatine neutralisées peut sans doute varier quelque peu, mais des essais ont montré que dans les conditions expérimentales choisies les quantités de sel en question ne peuvent pas influer sur la vitesse de solidification.

Les mélanges de neutralisation correspondants renfermaient de l'acide chlorhydrique en quantité suffisante pour neutraliser toute la lessive de soude ajoutée.

B. Mesurage et calcul de la concentration en ions hydrogène et hydroxyle.

Toutes les déterminations des concentrations en ions hydrogène ont été faites d'après la méthode de mesurage électrométrique sous la forme généralement usitée au Laboratoire de Carlsberg[1]. Bien que les liqueurs fussent exemptes d'acide carbonique, nous nous sommes servis du vase électrolytique construit par Hasselbalch[2], parce qu'il ne demande qu'une petite quantité de solution et qu'il permet de changer de liqueur d'une façon prompte et commode. Avant de verser la liqueur dans le vase électrolytique, on satura d'hydrogène l'électrode de platine, et pendant le cours du mesurage on fit barboter un courant d'hydrogène.

Le vase électrolytique et l'électrode au calomel aussi bien que la solution saturée de chlorure de potassium, furent placés dans une grande étuve à double paroi d'eau et munie d'un régulateur de mercure. Dans l'étuve on avait suspendu un barboteur avec de l'eau, par lequel on faisait passer l'hydrogène afin de le saturer de vapeur d'eau à la température en question avant de lui faire traverser la solution de gélatine. Les mesures ont été faites aux mêmes températures que celles des essais de digestion, à savoir 30°, 37°, 45°, 55°.

Comme «rhéocorde» nous nous sommes servis de deux boîtes de résistance contenant des résistances allant de 0,1 à 500 Ohm, et comme appareil à zéro a servi un électromètre capillaire évacué, fermé (d'après Luther, modèle Ostwald). Le calcul de la concentration des ions hydrogène par la tension mesurée — π — a été fait au moyen de l'équation[3]).

$$p_H^+ = \frac{\pi \div \pi_0}{0{,}0577 + 0{,}0002\ (t \div 18)}$$

t est la température en degrés centigrades, π la tension de la solution de gélatine, π_0 la tension à la même température

[1]) S. P. L. Sørensen: ces mêmes Comptes-rendus, **8**, 20 (1909).
[2]) K. A. Hasselbalch: *Ibid.*, **10**, 78 1901 .
[3]) S. P. L. Sørensen: *Ibid.*, **8**, 22 (1909).

d'une solution contenant par litre: 10^0 = 1 équivalent-gramme d'hydrogène sous la forme d'ions.

La valeur de π_0 à différentes températures a été déterminée récemment d'une façon très précise par R. Koefoed[1]). Au moyen d'interpolation graphique des chiffres trouvés par Koefoed, π_0 aux températures de 30^0, 37^0, 45^0 et 55^0 a été évalué à 0,3364 — 0,3355 — 0,3340 — 0,3309 volt. (Aux mêmes températures, le dénominateur de la fraction sus-indiquée sera de 0,0601 — 0,0615 — 0,0631 — 0,0651).

Étant donné que la «constante de dissociation de l'eau», c'est-à-dire le produit des concentrations en ions hydrogène et en ions hydroxyle de toute solution aqueuse, est invariable pour une même température, il s'ensuit que l'une de ces concentrations peut être calculée par l'autre quand ce produit-là est connu.

Au Laboratoire de Carlsberg cette constante n'a jusqu'ici été déterminée que pour 18^0, température à laquelle une longue série de mesures ont donné la moyenne $10^{\div 14,14}$. Au moyen de cette valeur on est à même de calculer la constante de dissociation à d'autres températures à l'aide de l'équation thermodynamique des isochores de réaction, lorsqu'on connaît la chaleur de dissociation de l'eau et sa dépendance de la température.

Le calcul indiqué, dont le détail serait trop long, donne pour la constante de dissociation $(= 10^{\div}(p_H^+ + p_{OH}^{\div})$

à 30^0	37^0	45^0	55^0
$10^{\div 13,73}$	$10^{\div 13,52}$	$10^{\div 13,29}$	$10^{\div 13,02}$

Pour calculer l'exposant des ions hydroxyle — $p_{OH}^{\div}$ —, on n'aura qu'à soustraire celui des ions hydrogène — p_H^+ — des exposants indiqués ci-dessus.

Au tableau I on trouve les valeurs de p_H^+ et au tableau II les valeurs correspondantes de $p_{OH}^{\div}$ calculées aux températures de 30^0—37^0—45^0—55^0 pour les mélanges mentionnés à la page 209, contenant 0,4 $^0/_{00}$ de trypsine active.

A la température de 45^0, nous avons fait deux mesures de la concentration en ions hydrogène de solutions renfermant 0,1 $^0/_{00}$ de trypsine; la solution enzymatique étant légèrement acide, p_H^+ s'est trouvé un peu plus élevé que pour les mélanges correspondants conte-

[1]) Les résultats n'ont été publiés jusqu'ici que chez K. A. Hasselbalch et Chr. Lundsgaard, dans la Biochem. Zeitschrift **38**, 81 (1912), et chez S. P. L. Sørensen, Ergebnisse der Physiologie, **12**, (1912).

nant 0,4 ‰ de trypsine. Toutefois, comme on le voit, l'écart est si insignifiant, qu'il était bien possible de calculer avec une précision suffisante les valeurs de p_H^+ pour les autres mélanges comme aussi pour ceux à 0,2 ‰ de trypsine. Dans les mélanges contenant 0,1 ‰ et 0,4 ‰ de trypsine, la différence entre les concentrations ioniques — exprimés en p_H^+ — s'est trouvée être, respectivement, de 0,04 et 0,07 ; les valeurs de p_H^+ pour les autres mélanges à 0,1 ‰ de trypsine ont, conséquemment, été calculées en ajoutant 0,05 aux valeurs de p_H^+ mesurées pour des solutions à 0,4 ‰. Pour les solutions à 0,2 ‰ de trypsine, les valeurs rapportées dans les tableaux VII et VIII résultent d'une addition de 0,03 aux p_H^+ déterminés pour les solutions de gélatine à 0,4 ‰ de trypsine.

Le tableau I donne aussi l'augmentation qu'a éprouvée la concentration en ions hydrogène pendant la durée des essais correspondants. Il apparaît à l'évidence que, grâce à l'action de l'acide borique, la modification a été diminuée au point de n'avoir aucune influence sur la détermination de la zone optimale. A part quelques rares exceptions, la modification n'atteint que 0,025, c'est-à-dire qu'elle correspond à 1,5 millivolt dans la tension mesurée.

Même si l'électrode est saturée d'hydrogène avant le mesurage, il se passera quelques minutes avant que la tension puisse atteindre la valeur répondant à la concentration en ions hydrogène, et pendant ce laps de temps la digestion aura déjà fait varier p_H^+; étant donné cependant que — en tout cas au commencement de la digestion et pour les concentrations ioniques dont il est question ici — la variation subie par p_H^+ est à bien peu de chose près proportionnelle au temps[1]), on pourra facilement calculer la valeur qu'avait p_H^+ au moment même où la gélatine et la trypsine furent mélangées. Dans le tableau se trouvent indiqués les p_H^+ calculés pour le début de l'essai; pour arriver au p_H^+ de la fin de l'essai, on n'aura qu'à faire la soustraction de la différence marquée.

Pour les essais sur la gélatine sans addition d'acide borique, les mesures ont porté sur des mélanges additionnés d'une enzyme soumise à l'ébullition. La concentration en ions hydrogène de ceux-ci était à peu près égale aux concentrations initiales, trouvées par extrapolation, de quelques mélanges correspondants renfermant une enzyme active.

---

[1]) Comp. les essais p. 207.

C. Mode opératoire.

Dans des ballons Kjeldahl en verre Iéna, d'une capacité de 100 cc., on mesure 40 cc. de la solution de gélatine principale diluée et additionnée d'acide borique et, d'autre part, 8 cc. des mélanges mentionnés p. 209, d'eau et de lessive de soude. Après env. vingt minutes de chauffage préalable, on ajoute 2 cc. d'une solution de trypsine, puis on agite énergiquement. Tant que dure la digestion, les mélanges sont laissés dans un grand bain d'eau muni d'un régulateur de toluène et d'un agitateur électrique.

La trypsine n'a pas été soumise à une chauffe préalable parce que quelques essais avaient montré que le refroidissement produit par la solution froide d'enzyme était très faible et que la température s'égalisa en moins d'une minute. Il est à remarquer également que cette chauffe amènerait des résultats douteux parce que dès la température de 37° la trypsine subit une décomposition sensible, et, comme l'enzyme ne peut être ajoutée à tous les mélanges à la fois, mais seulement à trente secondes d'intervalle, il s'en suivrait que la proportion d'enzyme active serait moindre dans les derniers échantillons que dans les premiers.

Après les délais indiqués dans les tableaux[1]), on prélève sur chaque mélange une prise de 5 cc., laquelle on transvase, à l'aide d'une pipette, dans une éprouvette à parois minces (d'un diamètre de 21 à 22 mm.), renfermant 1 cc. de mélange de neutralisation et ayant séjourné depuis au moins dix minutes dans un mélange de glace et d'eau. Après avoir bien agité la solution de gélatine neutralisée ainsi obtenue, on la refroidit, sans l'agiter de nouveau, pendant un quart d'heure dans de l'eau glacée, après quoi on juge de la consistance. Nous avons exprimé par des chiffres le résultat de cette appréciation, afin de pouvoir représenter par des courbes nos résultats expérimentaux et de faciliter la vue d'ensemble.

Ces chiffres, que pour abréger nous dénommerons «degrés de liquéfaction» de la gélatine, indiquent à quel point la faculté de solidification de la gélatine a diminué et, par conséquent, à quel point est avancée la décomposition protéolytique.

---

[1]) 5 secondes avant la fin de la réaction, on commença à prélever l'échantillon; le transvasement dans l'éprouvette et les agitations furent ordinairement terminés en moins de 5 sec. après l'expiration du temps indiqué.

Les degrés de liquéfaction sont:

0 signifie parfaitement solide: le morceau de gélatine ne se détache pas, même si l'on agite très fortement;
1 » solide; toutefois, des agitations énergiques peuvent en faire détacher une petite partie;
2 » solide, mais se fendille plus facilement;
3 » solide, bien que la surface tremble, si l'on agite;
4 » se détache facilement;
5 » presque ramollie;
6 » ramollie;
7 » très molle;
8 » presque à demi liquide;
9 » à demi liquide;
10 » épaisse (visqueuse);
11 » presque liquide;
12 » parfaitement liquide.

La différence entre ces valeurs, dont la détermination repose sur une appréciation personnelle, pourrait sembler trop insignifiante pour pouvoir s'observer avec tant soit peu de certitude. Néanmoins nous avons pu remarquer que dans une série d'échantillons on pouvait constater positivement si l'un d'eux était plus ou moins consistant que l'échantillon voisin, de sorte que nous n'avons pas établi un trop grand nombre de degrés. Comme c'est le cas pour toute appréciation personnelle, il faut quelque routine pour faire des déterminations uniformes. Pour différentes séries d'échantillons la détermination peut toutefois varier quelque peu, de sorte qu'il n'est pas légitime d'admettre que chacun de ces nombres se rapporte toujours à des consistances absolument identiques; pourtant ces différences d'appréciation ne sont pas si grandes que les degrés de liquéfaction 0—1—3—6—9—11—12 ne puissent se distinguer les uns des autres avec certitude.

Il appert donc de ce que nous venons de dire, que cette méthode permet d'effectuer les mesures d'une façon très nette et très prompte. On chauffe à la température voulue une solution de gélatine additionnée d'acide borique; on ajoute de l'enzyme et, après un délai convenable, on prélève un échantillon de 5 cc., qu'on introduit, à l'aide d'une pipette, dans des éprouvettes préalablement refroidies et qui contiennent 1 cc. d'une solution d'a-

cide chlorhydrique suffisamment concentrée pour neutraliser les 5 cc. de solution de gélatine. Après les avoir fait séjourner un quart d'heure dans l'eau glacée, on en retire les éprouvettes pour procéder ensuite à l'appréciation du degré de liquéfaction.

Cette méthode, qui se prête surtout aux recherches relatives à de faibles actions enzymatiques, présente en outre cet avantage que son emploi n'est pas rendu plus difficile par l'addition du tampon, qui est nécessaire dans la décomposition trypsique pour maintenir constante la concentration ionique pendant la durée de l'essai. Par contre, c'est à la présence de ce tampon qu'est dû le fait que le titrage au formol se prête difficilement aux recherches relatives aux décompositions protéolytiques à des concentrations ioniques correspondant à l'optimum de la liquéfaction de la gélatine ($p^+ =$ env. 9). En faisant usage du formol, on titre, en effet, jusqu'à ce que le liquide expérimenté ait atteint, approximativement, cette concentration ionique, et l'addition d'un tampon qui empêchera cette concentration de changer pendant la digestion, aura également pour conséquence que, au cours de la titration, la concentration des ions hydrogène ne sera modifiée que fort peu par l'addition de la lessive de soude, en d'autres termes, le virage ne sera pas net, le résultat du titrage pas exact.

Dans la recherche dont nous nous occupons ici, à savoir celle concernant la «liquéfaction de la gélatine», il est d'ailleurs encore un fait qui tend à justifier l'application de la méthode de Fermi avec les modifications que nous y avons apportées: Le nombre de liaisons peptidiques qui se dénouent pendant le temps où la gélatine se transforme au point de perdre sa faculté de se gélifier, est si faible que dans ce cas particulier un titrage au formol donnerait inévitablement des résultats moins nets et moins exacts que ceux obtenus par l'appréciation du degré de liquéfaction de la gélatine.

Pour éclaircir de plus près cet état de choses, nous allons citer un exemple:

On fit digérer à 30°, dans le délai indiqué plus loin en minutes, un mélange de 8×40 cc. d'une solution à env. 7 % de gélatine (200 gr. de solution principale étendue à 1000 cc.), $8 \times 1^{cc},1$ d'acide chlorhydrique normal, $8 \times 2^{cc},0$ de lessive de soude normale, $8 \times 4^{cc},9$ d'eau et $8 \times 2^{cc},0$ d'une solution à 1 % de trypsine. On n'y avait pas ajouté de tampon et, par suite, la concentration ionique change au cours de la digestion. 20 cc. du mélange digéré furent

etendus avec un égal volume d'eau, puis neutralisés et titrés au formol[1]) avec de la lessive de soude 0,2-norm. Résultats:

Minutes	0	30	34	40	50	60
p_H^+	10.0	9.6	—	9.5	9.3	9.2
Quantité, en cc., de NaOH exigée par la titration au formol	2.2	2.5	—	—	—	2.8
Degré de liquéfaction	0	2	5	8	12	12

D. Tableaux et Courbes.

Les tableaux III à IX résument les résultats des sept séries d'expériences dans lesquelles la situation de la concentration ionique optimale a été déterminée pour les températures 30°, 37°, 45° et 55°. La concentration enzymatique dans les quatre premières séries est de 0,4 °/₀₀, dans les deux suivantes de 0,2 °/₀₀, et dans la dernière de 0,1 °/₀₀. Les nombres consignés dans la première série horizontale indiquent la durée de la digestion en minutes, les numéros dans la première colonne verticale se rapportent aux mélanges de lessive de soude et d'eau (p. 209); pour chaque mélange on a aussi indiqué la concentration (exprimée par l'exposant sans signe) tant en ions hydrogène qu'en ions hydroxyle.

Les essais auxquels se rapportent les tableaux X et XI portent sur la gélatine sans addition d'acide borique et, par conséquent, les valeurs marquées sous les rubriques p_H^+ et p_{OH}^- ne représentent que les concentrations en ions hydrogène et en ions hydroxyle telles qu'elles étaient au début de l'essai (comp. p. 207). Pour les essais résumés dans le tableau X nous nous sommes servis de gélatine fraîche, tandis que pour ceux du tableau XI nous avons fait usage d'une solution de gélatine qui à l'état de solution à 7 °/₀ env. avait été laissée pendant 20 heures à la température de 37° en contact d'une lessive de soude 0,04-normale.

En dressant les courbes I à VII, on a porté p_H^+ en abscisse et le degré de liquéfaction en ordonnée. Pour chaque température nous avons dressé une suite de courbes; chacune de celles-ci suit les points qui se rapportent à un même temps, et les chiffres placés sous chaque courbe indiquent ce temps en minutes. Comme on peut le voir, le sommet, qui répond à l'optimum d'effet, se trouve à très peu de chose près à la même concentration ionique. La courbe VIII montre le déplacement que la température fait subir à la concentration optimale en ions hydrogène; on a porté p_H^+ en abscisse, et la température en ordonnée.

[1]) S. P. L. Sørensen: ces mêmes Comptes-rendus, **7**, 1 (1907).

Tableau I.

Concentration en ions hydrogène, exprimée en p_H^+, des solutions de gélatine employées, et modification subie par p_H^+ pendant la digestion.

N°		1	2	3	4	5	6	7	8
cc. de NaOH norm. pour 50 cc. de mélange		0,8	1,4	4,0	6,0	8,0	10,0	11,0	12,0
30°	p_H^+	7,44	7,84	8,76	9,18	9,61	10,25	10,98	11,86
	Modification subie en 50 minutes	0,011	–	0,017	0,020	0,010	0,070	0,050	0,015
37°	p_H^+	7,39	–	8,65	9,08	9,52	10,06	10,70	11,47
	Modification subie en 50 minutes	0,027	—	0,040	—	—	0,016	0,028	0,010
45°	p_H^+	7,28	7,65	8,57	9,02	9,43	9,83	10,45	11,17
	Modification subie en 30 minutes	0,026	0,022	0,022	0.017	0,024	0,020	0,020	0,016
55°	p_H^+	7,23	7,60	8,45	8,91	—	9,77	—	—
	Modification subie en 30 minutes	0,017	0,032	0,012	0,018	—	0,006	—	—
45° (0.1 °/₀₀ trypsine)	p_H^+	—	—	—	9,06	9,50	—	—	—
	Modification subie en 90 minutes	—	–	—	0,012	—	—	—	—

Tableau II.

Concentration en ions hydroxyle, exprimée en $p_{OH}^{\div}$ des solutions de gélatine employées.

N°	1	2	3	4	5	6	7	8	$p_H^+ + p_{OH}^{\div}$
Température: 30°	6,29	5,89	4,97	4,55	4,12	3,48	2,75	1,87	13,73
— 37°	6,13	—	4,87	4,44	4,00	3,46	2,82	2,05	13,52
— 45°	6,01	5,64	4,72	4,27	3,86	3,46	2,84	2,12	13,29
— 55°	5,79	5,42	4,57	4,11	—	3,25	—	—	13,02

Tableau III.

Degré de liquéfaction de gélatine digérée à la trypsine
(0,4 ‰ trypsine; 30°).

N°	p_H^+	p_{OH}^-	Temps de digestion en minutes						
			20	30	34	38	42	46	50
1	7,44	6,29	0	0	0	0	1	1	1
2	7,84	5,89	0	0	0	1	1	2	3
3	8,76	4,97	0	1	1	3	4	5	6
4	9,18	4,55	0	2	2	4	6	7	8
5	9,61	4,12	1	3	5	6	7	8	9
6	10,25	3,48	1	3	3	5	6	8	9
7	10,98	2,75	0	2	2	3	4	5	7
8	11,86	1,87	0	0	0	0	0	0	0

Tableau IV.

Degré de liquéfaction de gélatine digérée à la trypsine
(0,4 ‰ trypsine: 37°).

N°	p_H^+	p_{OH}^-	Temps de digestion en minutes								
			14	18	22	26	30	34	38	42	46
1	7,39	6,13	0	0	0	1	3	5	6	7	9
2	7,75	5,77	0	0	1	2	3	5	6	8	10
3	8,65	4,87	1	2	2	5	6	8	9	11	12
4	9,08	4,44	1	2	3	5	7	8	10	12	12
5	9,52	4,00	2	2	3	6	8	9	11	12	12
6	10,06	3,46	1	2	3	6	8	9	10	12	12
7	10,70	2,82	1	1	2	2	3	3	6	8	11
8	11,47	2,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tableau V.

Degré de liquéfaction de gélatine digérée à la trypsine
(0,4 ‰ trypsine; 45°).

N°	p_H^+	p_{OH}^-	Temps de digestion en minutes						
			6	10	14	18	22	26	30
1	7,28	6,01	0	1	1	3	6	9	12
2	7,65	5,64	0	1	2	4	8	11	12
3	8,57	4,72	0	3	4	6	9	12	12
4	9,02	4,27	1	3	5	6	9	12	12
5	9,43	3,86	0	2	2	6	9	12	12
6	9,83	3,46	0	1	1	2	6	7	12
7	10,45	2,84	0	0	0	0	0	0	0

Tableau VI.

Degré de liquéfaction de gélatine digérée à la trypsine
(0,4 ‰ trypsine; 55°).

N°	p_H^+	p_{OH}^-	Temps de digestion en minutes							
			6	10	14	18	22	26	30	34
1	7,23	5,79	0	1	5	7	11	12	12	12
2	7,60	5,42	0	2	5	8	12	12	12	12
3	8,45	4,57	0	2	6	8	12	12	12	12
4	8,91	4,11	0	1	5	7	9	12	12	12
5	9,35	3,67	1	2	5	6	7	11	12	12
6	9,77	3,25	1	2	2	2	2	3	4	6
7	10,30	2,72	0	1	1	1	1	1	1	1

Tableau VII.

Degré de liquéfaction de gélatine digérée à la trypsine
(0,2 ‰ trypsine; 37°).

N°	p_H^+	p_{OH}^-	Temps de digestion en minutes				
			70	80	90	100	120
1	7,42	6,10	2	3	3	5	9
2	7,78	5,74	3	3	5	6	10
3	8,68	4,84	5	6	7	9	12
4	9,11	4,41	5	6	8	10	12
5	9,55	3,97	6	7	9	11	12
6	10,09	3,43	6	7	8	10	12
7	10,73	2,79	2	2	3	5	6
8	11,50	2,02	0	0	0	0	0

Tableau VIII.

Degré de liquéfaction de gélatine digérée à la trypsine
(0,2 ‰ trypsine; 45°).

N°	p_H^+	p_{OH}^-	Temps de digestion en minutes						
			30	40	50	60	70	80	90
1	7,31	5,98	0	2	5	6	7	9	10
2	7,68	5,61	1	4	6	7	8	10	12
3	8,60	4,69	2	4	7	8	10	12	12
4	9,05	4,24	2	5	7	9	11	12	12
5	9,46	3,83	3	6	8	9	11	12	12
6	9,86	3,43	2	4	6	7	10	11	12
7	10,48	2,81	1	1	1	1	1	2	2
8	11,20	2,09	0	0	0	1	1	1	2

Tableau IX.

Degré de liquéfaction de gélatine digérée à la trypsine
(0,1 ‰ trypsine ; 45°).

N°	p_H^+	p_{OH}^-	Temps de digestion en minutes					
			60	80	100	120	140	160
1	7,33	5,96	1	4	5	7	8	10
2	7,70	5,59	1	5	6	8	9	11
3	8,62	4,67	2	6	6	9	10	12
4	9,06	4,23	2	6	7	10	11	12
5	9,50	3,79	2	6	6	10	10	12
6	9,88	3,41	1	4	5	7	7	9
7	10,50	2,79	1	1	1	1	1	1
8	11,22	2,07	0	0	1	1	2	3

Tableau X.

Degré de liquéfaction de gélatine exempte d'acide borique et digérée à la trypsine
(0,4 ‰ trypsine ; 30°).

N°	p_H^+	p_{OH}^-	Temps de digestion en minutes									
			30	32	34	36	38	40	42	44	46	50
1	—	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	11,4	2,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	10,7	3,0	0	1	1	4	4	5	5	6	8	9
4	10,2	3,5	1	2	3	5	6	6	7	9	11	12
5	9,8	4,0	2	2	5	6	6	8	8	11	12	12
6	9,3	4,6	1	1	5	6	6	8	8	11	12	12
7	8,1	5,6	0	1	2	4	—	—	—	7	9	11
8	6,8	6,9	0	0	0	0	—	1	—	2	5	6
9	—	—	0	0	0	0	—	0	—	0	0	0

Tableau XI.

Degré de liquéfaction de gélatine exempte d'acide borique et partiellement décomposée à la soude, puis digérée à la trypsine (0,4 ‰ trypsine; 30°).

N°	p_H^+	p_{OH}^-	Temps de digestion en minutes				
			7	10	12	15	30
1	—	—	—	—	—	1	6
2	—	—	—	—	—	9	12
3	10,2	3,5	3	6	8	12	12
4	9,7	4,0	3	6	9	12	12
5	9,1	4,6	3	7	10	12	12
6	8,3	5,4	1	5	9	12	12
7	—	—	1	2	6	—	—
8	—	—	—	—	—	1	7
9	—	—	—	—	—	0	2

Table I.

Degré de liquéfaction de gélatine digérée à la trypsine. 0,4 ‰ trypsine; **30°**. (Temps de digestion: 20—30—38—42—46—50 minutes).

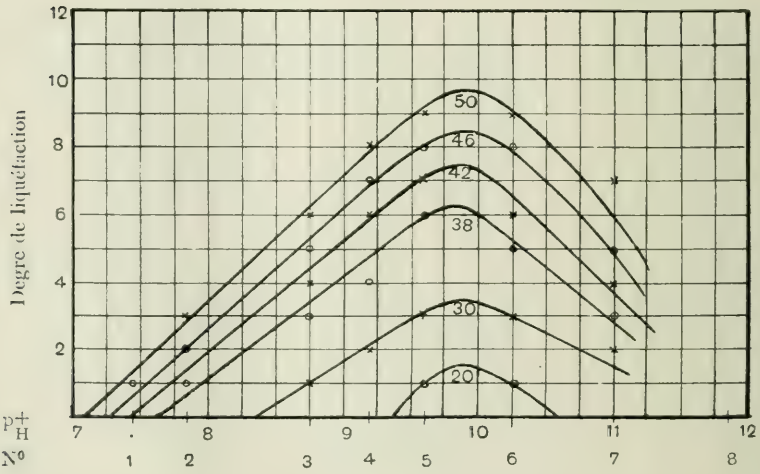


Table II.

Degré de liquéfaction de gélatine digérée à la trypsine. 0,4 ‰ trypsine: **37°**.
(Temps de digestion: 14—22—26—34—38—42 minutes).

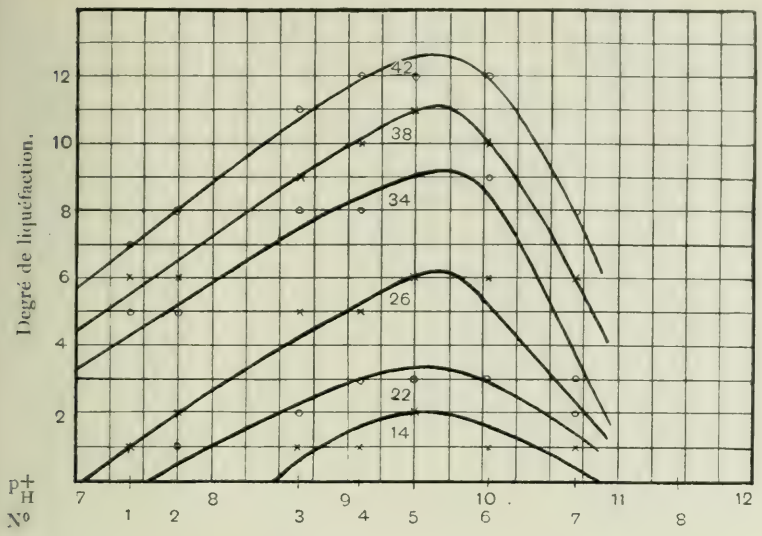


Table III.

Degré de liquéfaction de gélatine digérée à la trypsine. 0,4 ‰ trypsine; **45°**.
(Temps de digestion: 14—18—22—26 minutes).

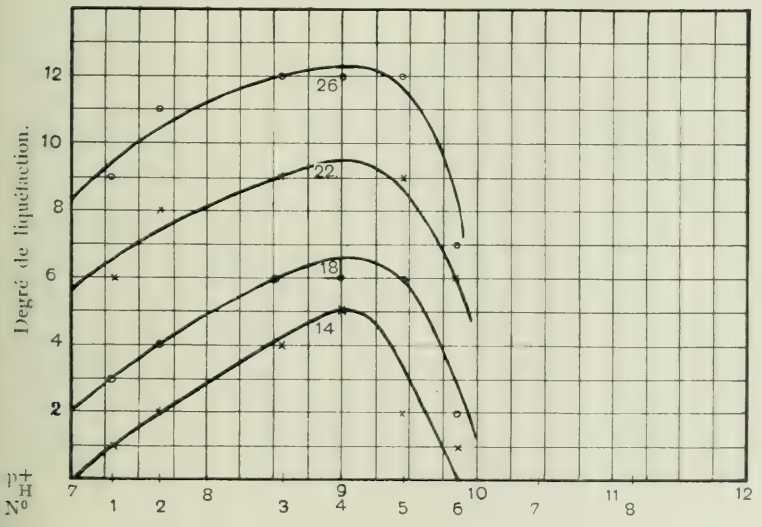


Table IV.

Degré de liquéfaction de gélatine digérée à la trypsine. 0,4 ‰ trypsine; **55°**.
(Temps de digestion: 14—18—22 minutes).

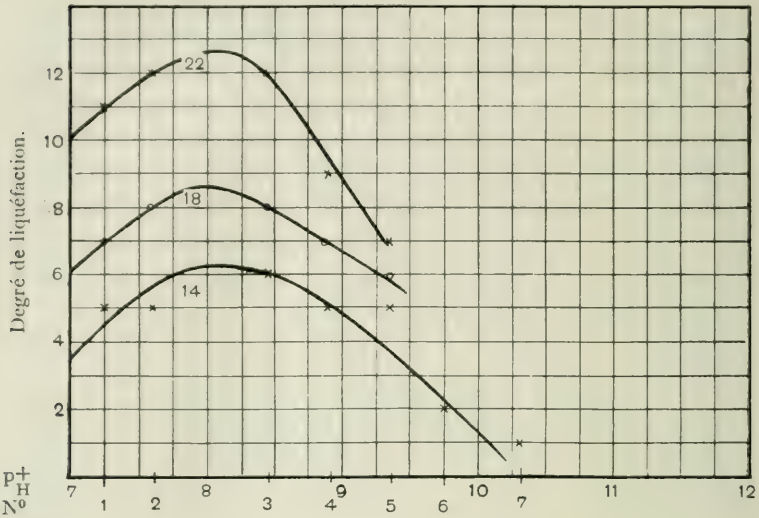


Table V.

Degré de liquéfaction de gélatine digérée à la trypsine. 0,2 ‰ trypsine; **37°**.
(Degré de digestion: 70—90—100—120 minutes).

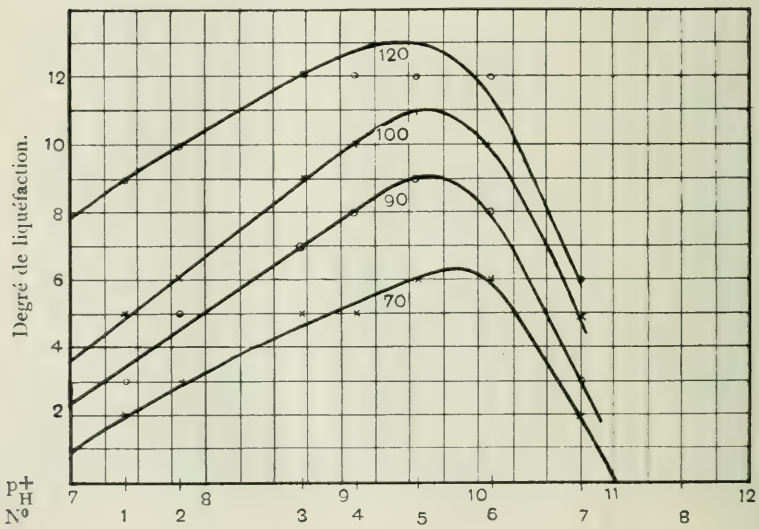


Table VI.

Degré de liquéfaction de gélatine digérée à la trypsine. 0,2 ‰ trypsine; 45°
(Temps de digestion: 30—40—50—60—70—80 minutes).

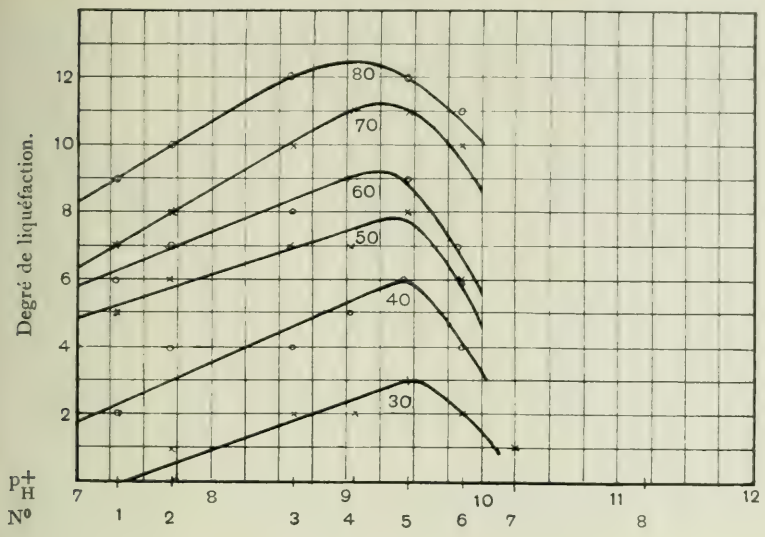


Table VII.

Degré de liquéfaction de gélatine digérée à la trypsine. 0,1 ‰ trypsine; 45°
(Temps de digestion: 60—80—120—160 minutes).

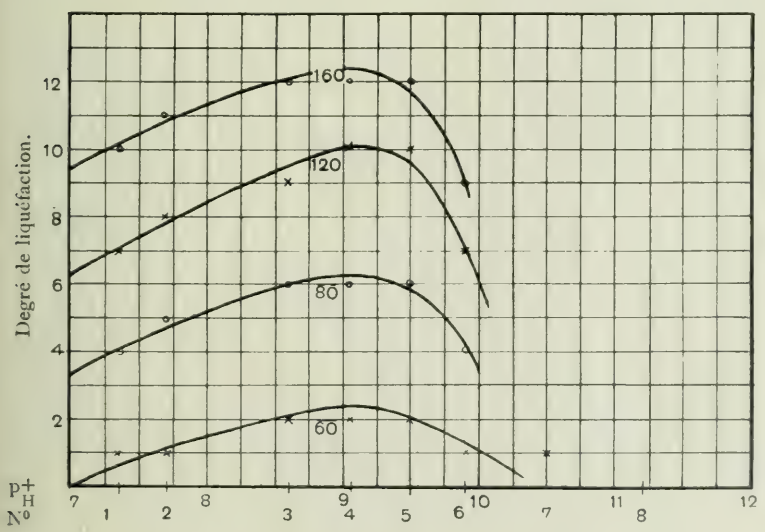
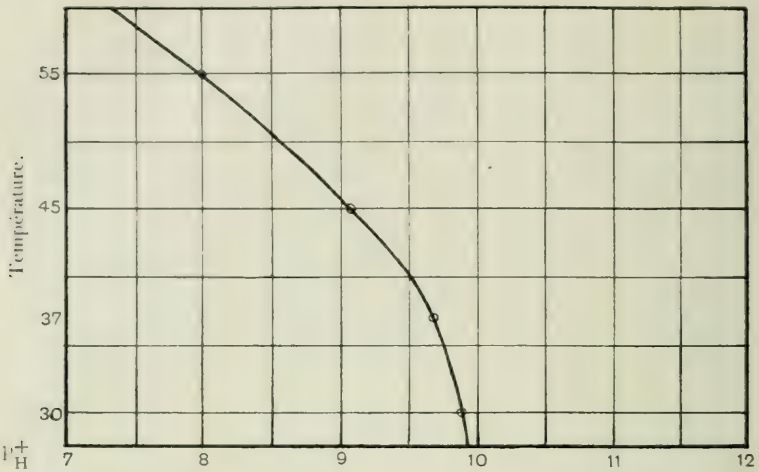


Table VIII.

Dépendance de la concentration optimale en ions hydrogène de la température.



E. Essais sur l'importance des ions hydroxyle pour le temps de solidification.

Ainsi qu'il ressortira bien nettement des deux exemples suivants, nos essais préliminaires ont déjà montré la nécessité d'opérer la solidification à une même concentration en ions hydrogène, autrement dit, de «neutraliser» le mélange avant la réfrigération.

A 40 cc. d'une solution à 7 % de gélatine, laquelle avait été laissée pendant 20 heures à 37° en contact de lessive de soude 0,04-n. (répondant à 1cc,6 de soude normale dans 40 cc.), on ajouta les doses ci-dessous indiquées d'acide chlorhydrique normal, de solution de trypsine et d'eau, jusqu'à concurrence de 50 cc. La concentration en trypsine dans l'essai sans neutralisation était de 3,2 ‰, dans l'essai avec neutralisation de 0,8 ‰ Tableau XII).

Par contre, lorsque la méthode fut employée sous la forme adoptée pour les expériences principales, la neutralisation ne joua pas de rôle appréciable.

Les mélanges nos 1, 5 et 8, préparés au moyen de gélatine additionnée d'acide borique, furent digérés à 37° pendant 38—26—46 minutes, après quoi l'on préleva un certain nombre d'échantillons de 5 cc. chacun, pour les transférer à l'aide de pipet-

Tableau XII.

Degré de liquéfaction de gélatine (30° exempte d'acide borique et digérée à la trypsine, soit sans neutralisation (3,2 °/₀₀ trypsine) soit avec neutralisation (0,8 °/₀₀ trypsine).

	Sans neutralisation				Avec neutralisation		
Digérée en minutes:	5	10	15	30	25	35	50
cc. d'acide chlorhydrique norm.							
0,0	6	12	12	12	2	5	9
0,4	0	12	12	12	6	7	12
0,6	0	6	12	12	6	9	12
0,8	0	0	9	12	7	9	12
1,0	0	0	6	12	1	7	12
1,2	0	0	0	12	0	2	6
1,4	0	0	0	0	0	0	0

tes dans 1 cc. d'eau ou dans 1 cc. du mélange de neutralisation (v. p. 209). On préleva un échantillon à des intervalles de trente secondes, pour faire la lecture du premier après un refroidissement de 5 minutes, du suivant après 10 minutes, et ainsi de suite; en fait, on ne peut faire qu'une seule fois la lecture d'un échantillon. Quant au degré de liquéfaction, on en fit la lecture après 5 — 10—15—20 minutes de réfrigération. On n'a pu observer aucune différence entre les échantillons neutralisés et ceux qui ne l'étaient pas. Puisque l'importance de la neutralisation devait se faire sentir le plus fortement dans les mélanges les plus alcalins, le n° 8 fut examiné séparément. Aussi bien l'échantillon neutralisé que l'échantillon alcalin se sont gélifiés avant la digestion en 4 minutes ½. tandis qu'après une digestion de 50 minutes ils y ont mis 10 minutes.

Le fait qu'ici il n'y a pas de différence entre la faculté de solidification des échantillons alcalins et celle des échantillons neutres, est dû à la présence de l'acide borique. En fait, une longue suite d'essais nous a permis de constater que la gélatine non additionnée d'a-

cide borique se gélifie bien moins vite en milieu alcalin qu'en milieu neutre — surtout si la gélatine a préalablement été chauffée en solution alcaline (et, par suite, décomposée par des ions hydroxyle) —, tandis qu'une gélatine additionnée d'acide borique prend aussi vite en milieu alcalin qu'en milieu neutre, que la solution de gelatine soit fraichement préparée ou qu'elle ait ete partiellement décomposée par des ions hydroxyle ou par la trypsine. Nous avons même pu constater qu'une solution de gelatine allemande additionnée d'acide borique, puis scindée partiellement par la soude, prenait plus vite en solution alcaline qu'en solution neutre, ce qui peut paraître assez étrange, étant donné que la faculté de solidification diminue rapidement lorsque la gélatine est chauffée en solution alcaline.

Nous allons citer deux de nos essais qui suffiront pour mettre en lumière les facteurs qui ont de l'importance pour la méthode que nous avons suivie. Afin de nous assurer que l'influence remarquable exercée par l'acide borique sur le temps de solidification n'était point due à une transformation qu'aurait subie notre solution de gélatine principale pendant sa conservation, nous répétâmes les essais avec une solution récemment préparée de la gélatine française aussi bien qu'avec une solution d'une gélatine allemande («Emulsionsgelatine» provenant de MM. Stoess & Cie à Heidelberg). Le résultat fut que ces solutions se comportaient d'une façon analogue à notre solution principale.

Dans le but de voir si, pour une gélatine n'ayant subi l'action ni de la trypsine ni des ions hydroxyle ou n'ayant été scindée que partiellement par ces agents, le temps de solidification serait variable pour des concentrations en ions hydrogène allant de 10^{-7} à 10^{-12}, nous n'avions qu'à examiner un mélange fortement alcalin en mesurant les délais de solidification — ou plutôt le degré de liquéfaction après un temps de réfrigération convenable — sur un certain nombre d'échantillons de 5 cc. dont quelques-uns devaient être neutralisés au moyen de 1 cc. d'acide chlorhydrique dilué, les autres étendus avec un égal volume d'eau. En effet, si le temps de solidification n'est pas le même pour les échantillons neutralisés et pour ceux qui étant étendus avec de l'eau sont restés alcalins, c'est évidemment pour les mélanges alcalins que la différence doit apparaître le plus nettement. Si l'on peut constater l'existence d'une pareille différence, il devient nécessaire de donner aux divers échantillons la même concentration ionique durant le cours de la solidification, afin que le degré de liquéfaction de la gélatine puisse être le seul facteur dont dépende la vitesse de solidification.

Pour faire cette recherche, nous avons procédé tout à fait de la même manière que pour les essais relatés en dernier lieu, lesquels avaient montré que le temps de solidification d'une solution de gélatine à acide borique n'est pas affectée d'une façon appréciable par la neutralisation.

La manière dont se passe la solidification d'une gélatine exempte d'acide borique est mise en lumière par une suite d'essais avec notre solution principale. Le mélange utilisé se composait de 40 cc. de solution à 7 % de gélatine, 9 cc. de lessive de soude 0,2-n. et 1 cc. d'une solution à 2 % de trypsine; pour neutraliser 5 cc. de ce mélange nous avons employé $0^{cc},8$ d'acide chlorhydrique 0,2 n. et $0^{cc},2$ d'eau, des mesures électrométriques ayant fait constater que la concentration des ions hydrogène, tant avant qu'après la neutralisation (p_H^+ égalant, respectivement, 11,3 et 7,0), devient à peu près la même que pour le mélange n° 8 dans les expériences principales. La digestion a été effectuée à 37°.

Temps de réfrigération, en minutes.	2	4	6	8	10	12	15
Degré de liquéfaction avant la digestion							
milieu alcalin	12	—	1	—	0		
» neutre	9	—	0	—	0		
Après 50 minutes de digestion							
milieu alcalin	12	11	6	3	1	0	
» neutre	11	2	1	0	0	0	
Après 100 minutes de digestion							
milieu alcalin	—	12	10	8	6	2	1
» neutre	—	7	6	2	1	0	0

De nos essais faits avec la gélatine allemande nous ne retiendrons que celui portant sur la gélatine additionnée d'acide borique, puis partiellement scindée par les ions hydroxyle. On fit dissoudre dans de l'eau distillée chaude 70 gr. de gélatine, $0^{gr},4$ de thymol et $0^{mol.-gr.},2$ d'acide borique, puis l'on compléta jusqu'à 1000 cc. Le mélange examiné était analogue à celui du n° 8: elle se composait de 40 cc. de la solution que nous venons d'indiquer, additionnée de 6 cc. de lessive de soude 2-n. et de 3 cc. d'eau. Après 18 heures d'abandon à la température de 37° dans l'étuve, on ajouta 1 cc. d'une solution à 2 % de trypsine.

Cet essai a donné les résultats que voici:

Immédiatement après l'addition de l'enzyme:

Temps de réfrigération, en minutes.	3	4	5	7	10
Degré de liquéfaction, alcalin	11	10	7	2	0
» » » , neutre	12	11	10	6	1

Après 40 minutes de digestion:

Temps de réfrigération, en minutes.	6	9	12	16	20	24	28
Degré de liquéfaction, alcalin	11	9	7	3	2	1	0
» » » , neutre	12	11	9	6	3	2	1

Ainsi donc c'est en milieu alcalin que la gélatine se gélifie le plus vite. Toutefois, la différence n'est pas bien grande.

Inutile de faire remarquer que cette action caractéristique de l'acide borique n'a rien à faire à la modification — étrangère au

sujet du présent mémoire — qu'apportent les borates dans la vitesse de solidification de la gélatine, et que l'explication ne saurait non plus être cherchée dans les propriétés de tampon de l'acide borique, parce que dans nos solutions renfermant de cet acide les concentrations ioniques, déterminées par électrométrie, étaient presque identiques à celles des solutions n'en renfermant pas.

Ainsi qu'il résulte de ces essais, les facteurs qui régissent la solidification de la gélatine sont encore aujourd'hui si peu connus et si incalculables, qu'il ne paraît pas recommandable d'omettre la neutralisation.

Dans le but de rechercher si l'action décomposante exercée par les ions hydroxyle — action dont nous avons parlé à la p. 205 — pouvait y être pour quelque chose dans les conditions choisies pour nos essais, nous avons enfin entrepris l'essai suivant sur la gélatine à acide borique, en substituant l'eau à la solution de trypsine.

Dans les mélanges n°s 5 et 8 nous déterminâmes, soit immédiatement, soit après abandon à 37° dans l'étuve, le degré de liquéfaction après différents délais de réfrigération, en ayant soin de neutraliser les échantillons avant de les réfrigérer.

Voici les résultats:

N° 5.

Temps de réfrigération, en minutes.....	2	3	3,5	4	4,5	5
Degré de liquéfaction des échantillons prélevés						
immédiatement	9	5	—	0	—	0
au bout de 1 heure.....	9	6	1	0	—	0
» » » 3 heures	9	6	3	2	1	0

N° 8.

Temps de réfrigération, en minutes	2	3	4	5	7	9	11	13	15
Degré de liquéfaction des échantillons prélevés									
immédiatement	11	5	0	0					
au bout de 1 heure	11	7	1	0					
» » » 3 heures	12	12	11	11	9	5	2	1	0

Etant donné que les expériences principales étaient effectuées en moins de 50 minutes et que la durée de la réfrigération était de 15 minutes, il appert que l'action décomposante

exercée par les ions hydroxyle ne donne lieu à aucune erreur dans la détermination de la zone optimale.

Il est à remarquer toutefois que cette action est néanmoins telle qu'elle rend impossible la préparation de mélanges de gélatine et de soude en quantités suffisantes pour une longue suite d'essais, parce que la conservation aussi bien que la liquéfaction réitérée nécessaire pour mesurer la quantité qu'il faudra pour un essai, auront pour conséquence de diminuer la faculté de se gélifier[1]) à tel point que les derniers essais seront sans aucune valeur. Une solution de gélatine doit être conservée à l'état neutre ou légèrement acide.

4. Quelques remarques sur les résultats.

Il ressort de nos tableaux et courbes que pour la première partie de la scission trypsique d'une solution à env. 6 % de gélatine, la concentration optimale des ions hydrogène a les valeurs suivantes:

La solution contenant 0,4 ‰ de trypsine:

à 30°	37°	45°	55°
$10^{-9,9}$	$10^{-9,7}$	$10^{-9,1}$	$10^{-8,0}$

La solution contenant 0,2 ‰ de trypsine:

à 37°	45°
$10^{-9,8}$—$10^{-9,5}$	$10^{-9,5}$—$10^{-9,1}$

La solution contenant 0,1 ‰ de trypsine:

à 45°
$10^{-9,1}$.

Etant donné que la constante de dissociation de l'eau augmente (en d'autres termes, que l'exposant sans signe diminue) lorsque la température s'élève, il s'en suit que des liquides ayant des températures différentes et des concentrations en ions hydroxyle identiques, présenteront des concentrations en ions hydrogène différentes: celles-ci seront les plus fortes pour les liquides ayant les températures élevées et les moindres pour ceux de température basse. Vu que la concentration en ions hydrogène optimale augmente avec la température, on pourrait se figurer que la concentration en ions hydroxyle était la même à toutes

[1]) Ceci a été déjà établi par Fermi: Archiv für Hygiene, **55**, 175 (1906).

les températures. Une simple inspection des chiffres consignés dans les tableaux nous apprendra cependant qu'il n'en est point ainsi: Avec 0,4 $^0/_{00}$ d'enzyme la concentration optimale en ions hydroxyle est

à 30^0	37^0	45^0	55^0
$10^{-3,8}$	$10^{-3,8}$	$10^{-4,2}$	$10^{-5,0}$.

Ainsi donc, si la température s'élève, l'optimum se trouve déplacé du côté alcalin vers le point neutre (comp. table VIII). Ceci tient probablement à ce que la concentration ionique optimale dépend, d'un côté, du degré de dissociation de la protéine et de celui de l'enzyme[1]) et, d'autre part, de la destruction de l'enzyme, et ces trois facteurs sont sujets à varier non seulement avec la concentration ionique du milieu et la dilution des corps réagissants, mais aussi avec la température.

Dans le cas considéré, c'est vraisemblablement la destruction de l'enzyme qui exerce l'influence prépondérante sur la situation de l'optimum aux différentes températures. On sait que la trypsine s'affaiblit vite en solution alcaline, et $10^{-9,9}$, valeur de l'optimum à 30^0, égale à peu près la concentration ionique d'une lessive de soude normale au $^1/_{10000}$. Dans le mélange n^0 8, dont la concentration ionique à 30^0 est voisine de celle d'une lessive de soude normale au $^1/_{100}$, l'enzyme dans aucun de nos essais n'a été capable, même après une longue digestion, de décomposer la gélatine au point d'amener le temps de solidification à dépasser 15 minutes. Toutefois, les essais relatés aux pp. 229—230, où le degré de liquéfaction a été déterminé après un temps de refrigération inférieur à 15 minutes, permettent de constater que même en milieu aussi alcalin l'effet n'est pas nul.

Vu que c'est aux plus fortes concentrations en ions hydroxyle que probablement la destruction de l'enzyme est la plus radicale, l'optimum doit se déplacer vers le côté acide à mesure que la durée de l'essai se prolonge, puisque la proportion active d'enzyme diminue avec le temps et que cette diminution est la plus forte dans les milieux les plus alcalins. Les essais avec 0,2 $^0/_{00}$ de trypsine de laissent entrevoir; mais à 0,4 $^0/_{00}$ et 0,1 $^0/_{00}$ l'optimum reste le même dans toutes les durées de ces essais. Il

[1]) Ou, pour mieux dire, de la dissociation des corps qui entrent en jeu lors de l'action enzymatique.

faut dire cependant que la méthode à la gélatine ne peut pas être considérée comme suffisamment précise pour légitimer des conclusions péremptoires.

Vu que la concentration ionique optimale varie avec la température, la température optimale doit à son tour varier avec la concentration ionique, et, dès lors, la détermination de cette température n'aura que peu de valeur si la concentration ionique n'est mesurée en même temps.

C'est ce qui ressort très nettement de nos tables, qui montrent que pour une solution aussi alcaline que l'est le n° 7 la température optimale est comprise entre 37° et 45°, alors que pour le n° 6 elle est voisine de 45° et que pour le n° 1 elle dépasse 55° [1]).

Si l'on compare les délais qui à l'optimum de concentration ionique sont nécessaires pour atteindre un certain degré de liquéfaction, on constate que, aux températures de 55°, 45°, 37° et 30°, ils sont les uns aux autres comme 1 : 1,2 : 1,8 : 2,8, proportions qui paraissent indiquer qu'à la concentration ionique optimale la température optimale se trouve à 55° ou peut-être un peu au-dessus.

Déjà dans notre introduction, il a été mentionné que K. Meyer a trouvé l'optimum pour la caséine-protéase bactérienne à $10^{-7,2}$, pour la caséine-pancréatine à 10^{-8}, et que Michaelis et Davidsohn donnent 10^{-8} pour la peptone-pancréatine; pour la gélatine-pancréatine nos mesures ont maintenant donné la concentration en ions hydrogène $10^{-9,7}$ à 37°, température à laquelle les déterminations des auteurs cités ont été effectuées. La diversité de ces résultats n'est pas faite pour nous surprendre, si nous songeons que, d'après les recherches d'Ascoli et Neppi, la décomposition des diverses protéines est influencée différemment par la modification de l'acidité d'une solution trypsique; c'est ainsi, par ex., qu'en solution neutre au tournesol la trypsine décompose à peu près au même point la gélatine, le sérum et le blanc d'œuf de poule, tandis qu'en solution légèrement acide («neutre» vis-à-vis du méthylorange) elle ne serait capable de décomposer que la gélatine, mais ni le sérum ni le blanc d'œuf [2]).

[1]) Rappelons que ces essais ont été entrepris dans un autre but que celui de déterminer l'optimum de la température.

[2]) Ascoli et Neppi, Zeitschrift für physiol. Chemie, **56**, 135 (1908); voir aussi Pollak, Beitr. zur chem. Physiol. und Path., **6**, 95 (1905), et Hattori, Arch. int. de Pharm. et de Thérap., **18**, 255 (1908), cité d'après Biochem. Zentralblatt, **8**, 1014 (1909).

Etant donné que Michaelis et Davidsohn ont étudié la scission enzymatique au moyen de la titration au formol et que, de notre côté, nous avons eu recours à une faculté d'ordre physique dont on ne connaît point la corrélation avec la structure chimique de la gélatine, il se peut bien que la détermination de la concentration optimale en ions hydrogène ait porté sur deux réactions n'ayant aucun rapport l'une à l'autre. S'il en était ainsi, la titration au formol des mélanges de gélatine digérés pourraient donner un optimum différent de celui qui résulte de l'appréciation du degré de liquéfaction; mais ainsi qu'il a été démontré en 3 C (p. 215), la titration au formol n'est pas utilisable en pareil cas.

Nous voudrions encore attirer l'attention sur ce fait remarquable qu'en augmentant la concentration enzymatique, on fera augmenter bien plus fortement encore la vitesse de la digestion; c'est ce qui ressort nettement de la comparaison des tableaux V, VIII et IX qui se rapportent à température de 45°, ainsi que des tableaux IV et VII où la température était de 37°; car pour les concentrations enzymatiques 0,4 °/₀₀, 0,2 °/₀₀ et 0,1 °/₀₀, les délais sont l'un à l'autre comme 1 : 3 : 6. Une série d'essais portant sur 0,8 °/₀₀ d'enzyme nous a également fait constater qu'ici les délais étaient égaux à un tiers et non à la moitié de ceux trouvés pour la solution à 0,4 °/₀₀ de trypsine.

Il est vrai que la plupart des chimistes qui se sont appliqués à examiner la façon dont l'action enzymatique dépend de la concentration de l'enzyme, ont pu établir une proportionnalité marquée entre elles, parce qu'ils ont opéré sur des solutions relativement faibles du corps à scinder et de l'enzyme; par contre, il a été établi par Grützner[1]) que l'action exercée par la ptyaline et la pepsine dans de fortes solutions du corps à scinder et de l'enzyme n'augmente pas proportionnellement à la concentration de cette dernière, mais bien plus lentement, tandis que, chose remarquable, pour la trypsine c'est le contraire qui est vrai, en ce sens que l'action de celle-ci sur des solutions relativement fortes de caséine augmente très rapidement avec la concentration. Ce résultat s'accorde, on le voit, parfaitement avec celui de nos essais sur la trypsine et la gélatine

[1]) Pflügers Archiv, **141**, 63 (1911).

Résumé.

Afin de pouvoir utiliser la méthode de gélatine de Fermi pour la recherche de l'action trypsique à des concentrations ioniques différentes, nous avons apporté deux modifications à cette méthode: d'abord nous avons ajouté de l'acide borique à la gélatine afin de maintenir constante durant la digestion la concentration ionique, et puis la solution de gélatine a été neutralisée après la digestion pour que dans tous les essais la solidification pût se produire à la même concentration ionique.

En conséquence, nous avons procédé comme suit:

Une solution de gélatine additionnée d'acide borique et ayant une concentration ionique déterminée, fut chauffée à la température à laquelle l'action enzymatique devait être observée; puis on ajouta l'enzyme, pour prélever après un temps convenable un échantillon de 5 cc., qu'on transvasa dans des éprouvettes préalablement réfrigérées et qui contenaient 1 cc. d'acide chlorhydrique de concentration telle que la prise de 5 cc. en fût neutralisée. Après réfrigération pendant 15 minutes dans de l'eau glacée, on apprécia le degré de liquéfaction.

De cette manière il fut établi que la concentration en ions hydrogène pour la liquéfaction de la gélatine aux températures de

	30^0	37^0	45^0	55^0
est de	$10^{-9,9}$	$10^{-9,7}$	$10^{-9,1}$	$10^{-8,0}$

(pour une solution à env. 6 % de gélatine et 0,4 ‰ de trypsine).

Ainsi donc, à mesure que la température s'élève, l'optimum se trouve déplacé du côté alcalin vers le point neutre.

Les essais ont montré en outre qu'à la concentration assez forte de la gélatine employée, la vitesse de digestion augmente bien plus vite que la concentration de l'enzyme, résultat qui s'accorde parfaitement avec les messures faites par Grützner de la décomposition trypsique de la caséine.

Quelques essais effectués dans le but d'éclaircir de plus près l'importance qu'a la neutralisation pour la méthode en question, nous ont permis de constater que la gélatine exempte d'acide borique prend plus vite en solution neutre qu'en solution alcaline, tandis qu'additionnée de cet acide les solutions de gélatine

se gélifient aussi rapidement quand elles sont alcalines que lorsqu'elles sont neutres. Pour une gélatine de provenance allemande, le temps de solidification d'une solution renfermant de l'acide borique et partiellement décomposée par la soude, s'est même trouvé être plus court en milieu alcalin qu'en milieu neutre.

Les recherches que nous venons de relater ont été exécutées au Laboratoire de Carlsberg a l'instigation de M. le Professeur S. P. L. Sørensen, à qui nous devons tous nos remerciements pour les conseils si précieux qu'il n'a cessé de nous prodiguer pendant tout le cours de notre travail.

Mai 1912.

ON THE PROTEÏD SUBSTANCES OF BARLEY, IN THE GRAIN ITSELF AND DURING THE BREWING PROCESSES

BY

H. SCHJERNING.

THIRD SECTION.

Transformation of the Proteïd Matters during Mashing, Boiling of Wort, and Fermentation.

1. Introduction.

THE memoir which is here brought before the public constitutes the third and last section of my researches concerning the proteïd matters occurring in the barley-grain and their behaviour in the various processes of brewing.

A particular introduction to this section is, I believe, superfluous, since it has already been given, in all essentials, in the preceding two sections[1]), particularly in regard to mashing and boiling of the wort.

In the course of the process of fermentation we shall certainly encounter new powers and new views; but I think it convenient to explain these hereafter when we come to treat of fermentation itself.

In calling this section the last, I do not mean to pretend that I have done anything like clearing up all the details of the problems dealt with, but only that it forms the close of a series of investigations which, in their main features, were planned by me some twenty years ago, and which I venture to think I have now accomplished in such a way and to such an extent that they may be fairly said to form a connected whole that throws

[1]) Compt. rend. des travaux du Laborat. de Carlsberg **6**, 229 (1906), and **8**, 169 (1910).

some light upon the formations and transformations of proteïd matters which take place in the barley grain in the course of its development and ripening, as also during the malting processes and the further treatment of the malt until we arrive at the ready stored beer.

2. The Principal Experiments.

The Mashing.

All the mashing experiments were carried out by the method of Proportionality: —

50 gr. of finely ground meal of malt of known amount of water are mixed up (mashed) with 200 cubic centimetres of distilled water at a temperature of 45° C., which is maintained for twenty minutes and then raised in the course of twenty-five minutes to 70°. After the mixture has been kept at this temperature for an hour, it is sligthly boiled over an open gas-light (ebullition sets in after five minutes), when it is directly cooled down in ice water to 15° and completed with distilled water to exactly 450 gr. After stirring up very carefully, the wort is filtered off in a folded filter of convenient size, the 100 cc. which have run off first being poured back to the filter.

I designate this procedure as «Normal Mashing», the modifications introduced in it being expressly stated in connection with each series of experiments.

The specific gravity of the wort filtered off is determined at 17.5° by the aid of a pycnometer (about 50 cc.) fitted with a thermometer and rising-pipe, and the amount of extract is then estimated by the aid of Balling's Tables (= k %).

The wort is diluted with distilled water in such a quantity that 100 cc. of the dilute wort will contain the extractive matters of 10 gr. of hydrous malt. The following estimates are then made on 25 cc. of dilute wort (except in the Seventh series of experiments): The total amount of soluble nitrogen; nitrogen belonging to the various groups of proteïd substances and proteïd decomposition products (by my precipitation method); the amount of free acid or acidity, and of soluble mineral constituents. These estimates are made exactly in the manner previously described[1], with the exception that, in estimating the

[1] Compt. rend. des travaux du Laborat. de Carlsberg **8**, 188 (1910).

amount of acid, I now always titrate with a $^1/_{10}$ normal solution of sodium hydroxide to the tone of colour which is produced when 2 cc. of a solution of phenolphtaleïn 1 % and 4 cc. of a $^n/_{15}$ mol. solution of secondary phosphate of sodium[1]) are added to 25 cc. of distilled water which has previously received an addition of Bismarck brown and tropeolin O in quantity to give the solution the same colour as the wort the acidity of which is to be determined.

The amount of nitrogen present in the form of ammonia is determined by distilling 50 cc. of the dilute wort with a convenient excess of burned magnesium in the manner described by A. Longi[2]) and by E. Winterstein and W. Bissegger[3]). In many cases the amount of nitrogen titrable by formol[4]) and the concentration of hydrogen ions[5]) were also determined in the dilute wort, and always by the methods given by S. P. L. Sorensen. Finally, the degree of limpidity was observed, and in some cases also the filtering velocity, which has been expressed in minutes.

In the fourth series of experiments the quantities of peroxidase and catalase were measured by adding to 2×25 cc. of dilute wort, 2.5 cc. of hydrogen peroxide (30 %) and 0 and 1 gr., respectively, of powdered guajacol[6]). At the end of two hours, during which the temperature was kept at 19—20°, the amount of oxygen developed was measured and the volume reduced to 0° and 760 mm.

If we find that the malt employed contains b % of dry matter and N % of total nitrogen in the dry matter, and if we further

[1] S. P. L. Sørensen: Compt. rend. des travaux du Laborat. de Carlsb. **7**. 1 (1907), and **8**, 1 (1909).

[2]) Landw. Versuchss. **32**, 15 (1886).

[3]) Zeitschr. f. physiol. Ch. **47**, 28 (1906).

[4] Compt. rend. des travaux du Laborat. de Carlsberg 7, 1 1907).
This determination was constantly carried out in the following manner: To 40 cc. of dilute wort were added 1 gr of $BaCl_2 + 2H_2OH$ and 2 cc. of solution of phenolphtaleïne. After the barium chloride had been dissolved, the solution was neutralised with barium hydroxide, received a further addition of 2 cc. of a saturated solution of barium hydroxide, and was completed to 50 cc. with distilled water. It was then shaken up and filtered through a dry filter. 30 cc. of the clear filtrate was rendered neutral towards litmus, received an addition of formol, and so on, according to Sørensen's method.

[5]) Ibid. **8**, 67 (1909).

[6] Ibid. **8**, 200, 321 1910 .

find that 25 cc. of dilute wort contain α gr. of soluble mineral constituents, an acidity corresponding to β cc. of $^1/_{10}$ norm. NaOH and in each nitrogen group or precipitation an amount of nitrogen corresponding to γ cc. of $^1/_{10}$ norm. acid, and that 50 cc. of dilute wort contain nitrogen in the form of ammonia corresponding to δ cc. of $^1/_{10}$ norm. acid, — then the results can be calculated by means of the following equations: —

$\frac{\alpha \cdot 4000}{b}$ = gr. of soluble mineral constituents of 100 gr. of malt dry matter.

$\frac{\beta \cdot 400}{b}$ = acidity or amount of free acids in 100 gr. of malt dry matter expressed in cc. of norm. NaOH.

$\frac{\gamma \cdot 560}{N \cdot b}$ = % of the total amount of nitrogen of the malt in each proteïd group (precipitation).

$\frac{\delta \cdot 280}{N \cdot b}$ = % of the total amount of nitrogen of the malt found in the form of ammonia.

I. Series of Experiments. The Extent of Proteïd Decomposition in the processes of Malting and Mashing.

In the First Experiment a sample of barley was used which could stand only a forty hours' steeping without the vitality being impaired. Thus it was of rather an indifferent quality for malting purposes

The barley itself was examined (Mark a). A convenient quantity was steeped forty hours with distilled water at the ordinary temperature of the laboratory. 200 gr. of the steep was dried [1]) and analysed (Mark b). The remaining part of the steep was malted (germinated) eight days at a temperature which rose gradually from 9° to 18°. Then the malt was kiln-dried in the usual manner, and the amount of rootlet dry matter was found [2]) to be 2.9 gr. per 100 gr. malt grain dry matter. The malt, after being freed from the rootlets, was ground and then examined (Marks c, d, e. f and g).

50 gr. of finely ground meal was mashed with 200 cc. of

[1]) Compt. rend. des travaux du Laborat. de Carlsberg **8**, 185 (1910).

[2]) Ibid. **8**. 189 1910 .

distilled water. The samples *a*, *b* and *c*, after being mashed (or, to put it more exactly, extracted) one hour at 1°, were completed in the usual manner to 450 gr. with distilled water (also 1°), and filtered on a double funnel which during filtration was kept at the same temperature of 1°. The sample *d* was mashed twenty minutes at 45°, cooled down to 15° and further treated by my Normal Method. Sample *e*, after being mashed twenty minutes at 45°, was in the course of twenty-five minutes completed to 70°, cooled down to 15°, and so on by the Normal Method. Sample *f*, after being mashed twenty minutes at 45° was in the course of twenty-five minutes completed to 70°, kept one hour at this temperature, and finally cooled down to 15°, and so forth, by the Normal Method. Sample *g* was throughout treated by the Normal Method.

The Second Experiment was made on a sample of barley which could stand seventy-two hours' full steeping without the vitality being weakened. Thus, in this respect is was a barley that was eminently fit for malting purposes. It was used for a malting experiment analogous to the first one, excepting that in the second experiment the barley received seventy-two hours' full steeping and was malted (germinated) nine days at a constant temperature (14°). This malt yielded 5.2 gr. of rootlet dry matter per 100 gr. of malt grain dry matter. It was examined by the same method as that used in the first experiment. The rootlets were also examined, for which purpose 10 gr. of hydrous rootlets (= 9.042 gr. of rootlet dry matter ∞[1]) 6.03 cc.) were extracted for twenty hours, at 18°, with 493.97 cc of distilled water saturated with toluene. After filtration, the solution was examined in exactly the same manner as the dilute wort (see above).

For the Third Experiment a sample of barley was employed which could stand a little more than forty-eight hours' full steeping without the vitality being impaired. After fifty-four hours' full steeping, the barley was malted and examined in exactly the same manner as mentioned in the first experiment, only with this difference that the barley and steep were not analysed in this case.

All the analytical results are exhibited in Table I.

[1] The sign ∞ means "corresponding to".

Found for the value				a	v	b	l	d	m	c	k	α	β	γ								δ	ε	ζ	pH measured in dilute wort
Experiment No.	Mark	50 gr. of meal	treated with 200 cc. of distilled water	Weight of 1000 aqueous corns in gr.	The material contains —% of		Ash		Nitrogen		25 cc. of dilute wort contains			nitrogen ∞ cc. of 1/10 norm. acid								50 cc. of dilute wort contains nitrogen ∞ 1/10 norm. acid as ammonia	Number of corns ∞ 25 cc. of dilute wort	
					water	dry matter	gr. of aqueous substance contains	gr. of ash	gr. of aqueous substance contains	nitrogen ∞ cc. of 1/10 norm. acid	% of extract (Ball.)	gr. of soluble ash	acid ∞ cc. of 1/10 norm. NaOH	as total nitrogen	as precipitable by $SnCl_2$	$HgCl_2$	$FeAc_2$	$UrAc_2$	$MgSO_4$	as titrable by formol				
I	a	Barley	1 hour at 1°	47.55	15.52	84.48	—	—	2.3120	24.0	0.72	0.0186	0.7	2.8	1.2	1.9	1.9	2.1	1.7	0.70		0.1	52.60	6.1
	b	Steep		41.62	6.03	93.97	—	—	2.7920	32.4	0.90	0.0202	1.2	3.6	1.2	2.1	2.2	2.4	1.8	0.80		0	53.60	6.0
	c										2.52	0.0174	1.4	9.0	2.5	4.2	4.6	5.0	3.9	2.70		0.4		6.1
	d		20 min. at 45°								3.10	0.0271	1.8	9.6	2.1	4.1	4.3	5.0	3.6	3.30		0.4		6.1
	e	Malt	+ up to 70°	37.65	4.62	95.38	—	—	2.1750	24.8	8.36	0.0312	2.2	10.3	1.2	3.5	3.9	4.9	2.9	3.50		0.4	66.40	6.1
	f		+ 1 hour at 70°								8.56	0.0288	2.3	10.7	1.1	3.5	3.9	5.0	2.8	3.60		0.4		6.1
	g		+ boiling								8.57	0.0285	2.3	10.6	1.1	3.3	3.8	4.8	2.8	3.50		0.4		6.1
II	a	Barley	1 hour at 1°	46.34	12.80	87.20	7.3135	0.1532	5.1546	48.0	0.87	—	0.7	2.7	1.1	1.9	1.9	2.0	1.6	0.75		0.1	53.95	6.1
	b	Steep		42.30	6.56	93.44	7.1414	0.1530	2.9465	29.6	0.63	0.0147	0.7	2.7	0.9	1.4	1.6	1.6	1.3	0.83		0	59.10	6.0
	c										2.30	0.0122	0.9	7.1	2.0	3.2	3.5	3.7	3.1	2.40		0.2		6.1
	d		20 min. at 45°								3.01	0.0235	1.7	8.3	2.1	3.8	4.0	4.5	3.4	2.70		0.2		6.1
	e	Malt	+ raised to 70°	37.53	6.80	93.20	6.7795	0.1425	3.6308	35.2	8.26	0.0293	2.0	8.9	1.2	3.2	3.3	4.0	2.5	2.80		0.2	66.63	6.1
	g		+ 1 hour at 70°																					
			+ boiling								8.48	0.0291	2.0	9.0	0.9	2.8	3.1	3.9	2.2	2.80		0.2		6.1
	The rootlets[1]				9.58	90.42	3.2640	0.1855	0.5550	16.8	1.00	0.0260	1.5	8.1	0.3	1.3	1.3	1.2	0.5	4.60		1.7	251.60	6.6
III	c		1 hour at 1°								1.85	0.0165	1.2	7.8	2.0	3.3	3.6	3.8	3.0	1.98		0.3		6.2
	d		20 min. at 45°								2.58	0.0246	1.9	9.9	1.9	3.6	4.0	4.2	2.9	3.64		0.4		6.2
	e	Malt	+ raised to 70°	36.40	3.73	96.27	—	—	—	[2]	8.11	0.0296	2.4	11.0	1.4	3.2	3.8	4.4	2.4	3.92		0.4	68.70	6.1
	f		+ 1 hour at 70°								8.39	0.0301	2.4	11.4		3.2	3.9	4.6	2.5	3.86		0.5		6.1
	g		+ boiling								8.42	0.0300	2.4	11.3	1.3	3.1	3.9	4.5	2.5	—		0.5		6.1

[1] In the course of malting, 1000 barley grains had developed 18.20 gr. of rootlet dry substance. 10 gr. of aqueous rootlets were extracted with 494 cc. of distilled water.

[2] My Journal does not give the analytical numbers, but mentions simply that the malt dry substance contains 5.29 % of total nitrogen.

II. Series of Experiments. The Influence of the Degree of Fineness of Malt Meal.

Three equal portions of the malt sample were each of them ground to, respectively, Fine Meal (first-rate Seck), Coarse Meal (about 40° Seck) and Groat. The degree of fineness of the last-mentioned sample may be said to answer broadly to equal parts of coarse meal and groat of different size. The samples were examined after being mashed by the Normal Method. The results are shown in Table II.

TABLE II.

Malt dry matter contains 1.60 % of total nitrogen and 2.38 % of ash.

Found for the value	v	b	k	α	β	γ						δ
Normal Mashing.	The material contains —% of		% of extract (Ball.)	gr. of soluble ash	25 cc. of dilute wort contains							50 cc. of dilute wort contains nitrogen corresponding to cc. of 1/10 norm. acid as ammonia
Degree of fineness					corresponding to cc. of 1/10 norm. NaOH	nitrogen corresponding to cc. of 1/10 norm. acid						
							as precipitable by					
	water	dry matter			acid	as total nitrogen	$SnCl_2$	$HgCl_2$	$FeAc_3$	$UrAc_2$	$MgSO_4$	
Fine Meal	7.66	92.34	8.28	0.0272	2.1	10.0	1.0	3.2	3.6	4.3	2.5	0.4
Coarse Meal	7.85	92.15	8.21	0.0272	2.1	9.9	1.0	3.0	3.5	4.2	2.4	0.3
Groat	7.64	92.36	8.17	0.0283	2.1	9.8	1.1	3.0	3.4	4.2	2.4	0.3

III. Series of Experiments. The Significance of the Concentration of the Mash.

4 × 50 gr. of fine Meal of the same malt sample were mashed with, respectively, 100, 200, 300 and 350 cc. of distilled water at 45°. and further treated by the Normal Method. The analytical results are given in Table III.

IV. Series of Experiments. The Significance of the Mashing Temperature.

50 gr. of fine Meal (from the same malt sample) was mashed with 200 cc. of distilled water at a temperature determined in each experiment. The temperature ranged from 1° to 81° and was kept constant for exactly one hour, after which the mixture

TABLE III.

Malt dry matter contains 1.00 % of total nitrogen and 2.38 % of ash.

Found for the value	a	b	k	α	β	γ					δ
Normal Mashing. 50 gr. of fine meal mashed with cc. of distilled water	The fine meal contains —% of		% of extract Ball.	gr. of soluble ash	25 cc. of dilute wort contains ≈ cc. of 1/10 norm. NaOH	nitrogen ≈ cc. of 1/10 norm. acid					50 cc. of dilute wort contains nitrogen ≈ cc. of 1/10 norm. acid as ammonia
	water	dry matter				as total nitrogen	as precipitable by				
							$SnCl_2$	$HgCl_2$	$FeAc_3$	$UrAc_2$	$MgSO_4$	
100	8.24	91.76	8.17	0.0272	2.1	10.5	1.4	3.2	3.6	4.3	2.3	0.5
200			8.20	0.0269	2.1	10.3	1.4	3.2	3.7	4.2	2.4	0.4
300			8.25	0.0300	2.1	10.1	1.3	3.2	3.7	4.4	2.4	0.5
350			8.21	0.0287	2.1	10.0	1.1	3.2	3.7	4.4	2.5	0.4

was directly[1] cooled down to 15° and further treated by the Normal Method. When the temperature was less than 15°, it was of course kept constant even while the wort was filtered off and diluted. The analytical work was commenced immediately after the wort was diluted. The results are shown in Table IV.

V. Series of Experiments. The Influence of the Duration of Initial Mashing.

4 × 50 gr. of fine Meal same malt sample were mashed with 200 cc. of distilled water at 45°. In the First experiment this temperature was kept constant for 0, in the Second for 20, in the Third for 30, and in the Fourth for 60 minutes, when the mashing of all the four samples was finished according to the Normal Method, and so forth. The analytical results are given in Table V.

VI. Series of Experiments. The Influence of the Duration of Boiling.

Four samples of fine Meal from the same malt were subjected to a Normal Mashing. After it was completed, one of the samples was directly cooled in ice water to 15° (without boiling),

[1] On account of the results of the experiments published in the Zeitschr. f. anal. Ch. **34**, 136 (1895), the mashing mixture is not boiled up.

The malt meal contains 8.50 % of water and 91.50 % of dry matter. Malt dry matter contains 1.74 % of total nitrogen.

Found for the value	k	α	β	γ							δ	u	m	PH measured in dilute wort
50 gr. of fine meal mashed 1 hour with 200 cc. of distilled water at the temperature	% of extract (Ball.)	gr. of soluble ash	25 cc. of dilute wort contains nitrogen ≏ cc. of 1/10 norm. acid: acid ≏ cc. of 1/10 norm. NaOH	as total nitrogen	as precipitable by $SnCl_2$	$HgCl_2$	$FeAc_3$	$UrAc_2$	$MgSO_4$	as titrable by formol	50 cc. of dilute wort contains nitrogen ≏ cc. of 1/10 norm. acid as ammonia	25 cc. of dilute wort develops — cc. of oxygen at 0° and 760 m.m. without guajacol	25 cc. of dilute wort develops — cc. of oxygen at 0° and 760 m.m. with guajacol	
1°	2.15	0.0162	1.6	7.9	2.2	3.5	3.8	4.3	3.3	2.5	0.3	8.1	4.2	6.1
10°	2.30	0.0208	1.8	8.5	2.6	3.8	3.9	4.8	3.5	2.7	—	10.3	6.9	6.1
20°	2.55	—	2.1	9.2	2.7	4.3	4.3	5.3	3.8	3.1	0.4	15.7	6.5	6.1
32°	2.85	0.0309	2.3	10.2	2.8	4.3	4.4	5.3	3.6	3.7	—	11.9	6.6	6.1
38°	3.03	—	2.5	10.7	2.4	4.2	4.3	5.3	3.5	4.0	0.4	9.6	7.1	6.1
45°	3.65	0.0327	2.7	11.1	2.3	4.1	4.3	5.3	3.3	4.0	—	9.3	6.4	6.1
50°	5.46	0.0328	2.6	10.9	2.0	3.9	4.3	5.4	3.3	3.5	0.4	—	—	6.1
55°	6.76	0.0329	2.5	10.7	1.8	3.7	4.4	5.3	3.2	3.3	—	7.8	4.8	6.1
61°	8.12	0.0309	2.4	9.9	—	3.1	3.5	4.6	2.7	3.1	0.3	—	—	6.1
65°	8.14	0.0311	2.3	9.6	1.4	3.1	3.4	4.5	2.6	2.9		7.0	3.7	6.1
71°	8.01	0.0261	1.8	8.4	1.3	3.0	3.4	4.2	2.3	2.6	0.3	—	—	6.1
76°	7.98	—	1.7	8.1	1.2	2.7	3.3	4.1	2.3	2.5		5.2	4.1	6.1
81°	7.91	0.0255	1.5	7.1	1.2	2.4	2.9	3.6	1.9	2.1	0.3	—	—	6.1

TABLE V.

Malt dry matter contains 1.00 % of total nitrogen and 2.38 % of ash.

Found for the value	v	b	k	α	β	γ						δ
50 gr. of fine meal mashed normally after initial mashing with 200 cc. distilled water at 45° in — minutes	The fine meal contains —% of		% of extract (Ball.)	25 cc. of dilute wort contains								50 cc. of dilute wort contains nitrogen ∞ cc. of 1/10 norm. acid as ammonia
	water	dry matter		gr. of soluble ash	acid ∞ cc. of 1/10 norm. NaOH	nitrogen ∞ cc. of 1/10 norm. acid						
						as total nitrogen	as precipitable by					
							$SnCl_2$	$HgCl_2$	FeAc3	$UrAc_2$	$MgSO_4$	
I 0	7.88	92.12	8.20	0.0277	2.1	9.7	1.8	3.1	3.5	4.1	2.5	0.2
II 20			8.26	0.0289	2.3	10.1	1.9	3.2	3.6	4.2	2.5	0.3
III 30			8.26	0.0297	2.3	10.2	1.9	3.3	3.7	4.2	2.5	0.3
IV 60			8.28	0.0295	2.4	10.3	2.1	3.3	3.6	4.2	2.5	0.3

another was slightly boiled one minute after the manner of the Normal Method, a third was boiled ten, and a fourth twenty minutes. Finally, all the samples were cooled to 15° and further treated by the Normal Method, and so forth. The analytical results are given in Table VI.

TABLE VI.

Malt dry matter contains 1.00 % of total nitrogen and 2.38 % of ash.

Found for the value	v	b	k	α	β	γ						δ
After finished Normal Mashing, the mixture was boiled over an open gas light	The fine meal contains —% of		% of extract (Ball.)	25 cc. of dilute wort contains								50 cc. of dilute wort contains nitrogen ∞ cc. of 1/10 norm. acid as ammonia
	water	dry matter		gr. of soluble ash	acid ∞ cc. of 1/10 norm. NaOH	nitrogen ∞ cc. of 1/10 norm. acid						
						as total nitrogen	as precipitable by					
							$SnCl_2$	$HgCl_2$	FeAc3	$UrAc_2$	$MgSO_4$	
Without boiling (70°)	8.08	91.92	8.23	0.0287	2.1	10.1	2.0	3.3	3.7	4.2	2.4	0.3
1 minute			8.25	0.0288	2.1	10.2	1.9	3.2	3.7	4.2	2.4	0.3
10 minutes			8.22	0.0280	2.1	10.0	1.5	3.0	3.5	3.9	2.2	0.3
20 minutes			8.23	0.0286	2.1	9.8	1.4	2.8	3.3	3.8	2.2	0.4

VII. Series of Experiments. The Significance of the Elutriation of the Husks.

4 × 50 gr. of fine Meal were treated throughout by the Normal Method. After the wort had run completely off the husks,

the latter were washed with distilled water (20°, in the Second experiment once, in the Third twice, and in the Fourth three times with 50 cc. The four wort samples were each of them completed with distilled water up to 500 cc., and analysed after the usual manner, with this difference, however, that, on account of the greater degree of dilution, each determination required 50 cc. af wort. The final results must be calculated by other equations than those given on page 240, namely the following ones: —

$10 \cdot k \cdot$ specific gravity of wort = gr. of extract of 100 gr. of hydrous malt = E.

$\frac{E \cdot 100}{b}$ = gr. of extract of 100 gr. of malt dry matter.

$\frac{\alpha \cdot 2000}{b}$ = gr. of soluble ashes of 100 gr. of malt dry matter.

$\frac{\beta \cdot 200}{b}$ = amount of acid in 100 gr. of malt dry matter expressed in cc. of norm. NaOH.

$\frac{\gamma \cdot 280}{N \cdot b}$ = % of the total amount of nitrogen of the malt found in each determination of proteïd substance (precipitation).

$\frac{\delta \cdot 280}{N \cdot b}$ = % of the total amount of nitrogen of the malt found in the form of ammonia.

The analytical results are set forth in Table VII.

TABLE VII.

Malt dry matter contains 1.60 % of total nitrogen and 2.38 % of ash.

Found for the value	v	b	k	α	β	γ					δ
50 gr. of fine meal mashed by the Normal Method. The husks elutriated — times with distilled water, each time 50 cc.	The fine meal contains —% of				50 cc. of dilute wort contains						
	water	dry matter	% of extract (Ball.)	gr. of soluble ash	acid ≙ cc. of $^1/_{10}$ norm. NaOH	nitrogen ≙ cc. of $^1/_{10}$ norm. acid					50 cc. of dilute wort contains nitrogen ≙ cc. of $^1/_{10}$ norm. acid as ammonia
						as total nitrogen	as precipitable by				
							$SnCl_2$	$HgCl_2$	$FeAc_3$	$UrAc_2$	$MgSO_4$	
0	8.31	91.69	5.77	0.0473	3.6	17.1	1.6	5.1	5.9	7.5	4.0	0.5
1			6.19	0.0495	3.8	18.3	1.8	5.5	6.6	8.0	4.1	0.4
2			6.29	0.0528	3.9	—	2.3	5.6	6.5	8.3	4.3	0.3
3			6.54	—	4.1	18.6	2.3	6.0	6.8	8.3	4.5	0.3

VIII. Series of Experiments. The Effect of Salts.

All the mashings were carried out by the Normal Method. 50 gr. of fine Meal (still the same malt sample) was mashed with 200 cc. of mashing water of known content of salt. At the end of the mashing, the mixture was cooled and its weight completed to 450 gr. by adding the necessary quantity of distilled water, as before.

The effects of the following salts were examined: — the normal chlorides and sulphates of the metals sodium, calcium and magnesium, and the free acids and bases answering to these salts (as for $Mg(OH)_2$, however, it was dissolved in the form of acid carbonate, because the hydroxide is too difficult to dissolve). From these salts, acids and bases I prepared standard solutions each of which contained $^1/_{50}$ gr.-equivalent in 1000 cc. of the substance concerned. See Table VIII.

TABLE VIII.

Base / Acid / Salt	Preparation of standard solutions containing a) $^1/_{50}$ gr.-equivalent base, acid or salt to one l. b) $^2/_{50}$ gr.-equivalents salt to one l.
	a) with distilled water
NaOH	20 cc. of norm. NaOH made up to 1000 cc. solution.
$Ca(OH)_2$	476.2 cc. of a solution of calcium hydroxide, of which 25 cc. ≙ 10.5 cc. $^1/_{10}$ norm. HCl, made up to 1000 cc. solution.
$Mg(HCO_3)_2$	0.404 gr. of MgO was dissolved and made up to 1000 cc., with supply of CO_2.
HCl	20 cc. of norm. HCl made up to 1000 cc. solution.
H_2SO_4	20 cc. of norm. H_2SO_4 made up to 1000 cc. solution.
NaCl	1.17 gr. of sodium chloride to 1000 cc. solution.
Na_2SO_4	3.22 gr. of Na_2SO_4, $10\,H_2O$ to 1000 cc. solution.
$CaCl_2$	1.00 gr. of $CaCO_3$ + 20 cc. of norm. HCl to 1000 cc. solution.
$CaSO_4$	1.72 gr. of $CaSO_4$, $2\,H_2O$ to 1000 cc. solution.
$MgCl_2$	0.404 gr. of MgO + 20 cc. of norm. HCl to 1000 cc. solution.
$MgSO_4$	2.46 gr. of $MgSO_4$, $7\,H_2O$ to 1000 cc. solution.
	b) with distill. water
Na_3PO_4	3.56 gr. of Na_2HPO_4, $2\,H_2O$ + 20 cc. of norm. NaOH to 1000 cc. solution.
Na_2HPO_4	3.56 gr. of Na_2HPO_4, $2\,H_2O$ to 1000 cc. solution.
NaH_2PO_4	1.78 gr. of Na_2HPO_4, $2H_2O$ + 0.71 gr. of P_2O_5 (≙ 82.0 cc. of H_3PO_4 containing 1.197 % of H_3PO_4) to 1000 cc. solution.

With these solutions the following experiments were undertaken, 50 gr. of Fine Meal being mashed, respectively, with:

№	Distilled Water cc.	+	Salt Solution Standard) cc.	∞ Gr.-equivalents of Salt in 1000 cc. of Mashing Water
I	200	+	0	∞ 0 = Control
II	150	+	50	∞ $^1/_{200}$
III	100	+	100	∞ $^1/_{100}$
IV	0	+	200	∞ $^1/_{50}$

Mashing experiments were also made with the primary, secondary and tertiary phosphates of sodium, from which standard solutions were prepared containing $^3/_{50}$ gr.-equivalents in 1000 cc. (see Table VIII). If these solutions are diluted in the manner described above, the mashing water will contain, in 1000 cc., 0, $^3/_{200}$, $^3/_{100}$ and $^3/_{50}$ gr.-equivalents of salt. These experiments, however, are only in a certain measure conclusive, as will be seen from what follows.

As the addition of salts, acids or bases in the above-mentioned proportions gives rise to fairly considerable alterations in the acidity and amount of salt of the medium in which the precipitation is effected, it will be necessary to examine whether the various proteïd precipitations are quantitatively influenced by these alterations. This question was solved through a series of experiments in which, to unhopped wort from the Carlsberg Brewery, salts, acids and bases were added in such quantities that the amounts were brought to $^1/_{50}$ and $^3/_{50}$ gr.-equivalents, respectively, in 1000 cc. of mashing water, thus answering to the highest concentrations that are used at all in the principal experiments.

The malt meal employed in these contained about 8 % of water, and each mashing was made with 50 gr. of hydrous meal and 200 cc. of mashing water (salt solution). After the mashing was completed, the total mash was made up to 450 gr. with distilled water. Of the wort filtered off (the concentrated wort 88 gr.[1]) was in all the experiments diluted to 100 cc. by the addition of distilled water, and it is with this dilute wort that the whole of the analytical work was carried out. Now if 1000 cc. of salt solution (mashing water) contain a gr. of salt, then 200 cc.

[1] See Foot-note p. 253.

contain $\frac{a}{5}$ gr. Consequently, 404 gr. of concentrated wort contain $\frac{a}{5}$ gr. of "added" salt, and 88 gr. of concentrated wort $\frac{88 \cdot a}{5 \cdot 404}$ gr. of salt. In other words, 300 cc. of dilute wort will constantly contain $\frac{3 \cdot 88 \cdot a}{5 \cdot 404}$ gr. of "added" salt. If therefore to 150 cc. of unhopped wort (containing approximately 12.3 % of extract) we add z cc. of salt solution, and if we make the resulting mixture up to 300 cc. by adding distilled water, then we shall get a dilute wort containing exactly the same amount of »added« salt as a dilute wort from an experimental mashing with 200 cc. of salt solution (containing $^1/_{50}$ or $^3/_{50}$ gr.-equivalents of salt in 1000 cc.). We find:

$$z = \frac{1000 \cdot 3 \cdot 88}{5 \cdot 404} = 130.7 \text{ cc. of salt solution } (^1/_{50} \text{ or } ^3/_{50} \text{ gr.-equivalents}).$$

The analytical results of these precipitations are given in Table IX. The control samples consist of course of the wort samples without addition of salt.

These experiments show clearly enough that our precipitations with stannous chloride, ferric acetate and magnesium sulphate (in acid liquids) are in no case influenced by the (maximum) proportions employed in the principal experiments, whereas the uranium acetate precipitation is influenced by the addition of phosphates, and the mercuric chloride precipitation both by the addition of phosphates and by considerable alterations in the acidity of the wort. In the case of the last-mentioned precipitation the error is easy to correct if it is due to a modification of the acidity of the wort, because — as shown by the column headed ($HgCl_2$-b) — this precipitation becomes normal when the precipitation medium is given the same acidity as the control sample, either by the addition of $^1/_{10}$ norm. HCl or $^1/_{10}$ norm. NaOH. On the other hand, where phosphates are added, both the precipitation by mercuric chloride and that of uranium acetate are too high even if the precipitation medium has the same acidity as the control sample (see columns *a* and *b*). The column *c* shows that, in the case of the uranium acetate precipitation, this increase is not due to the formation of double-salts of ammonia[1]). That the presence of considerable proportions of phos-

[1] Zeitschr. f. anal. Ch. **36**, 643 (1897); **39**, 545 (1900).

TABLE IX.

Experiment No.	300 cc. of wort contains	"Added" salt corresponding to — gr.-equivalents of salt to 1000 cc. of mashing water	25 cc. of wort contains acid ≙ cc. of 1/10 norm. NaOH	25 cc. of wort contains nitrogen ≙ cc. of 1/10 norm. acid: as total nitrogen	as precipitable by: $SnCl_2$	$HgCl_2$ *) a	$HgCl_2$ *) b	FeAc 3	$UrAc_2$ *) a	$UrAc_2$ *) b	$UrAc_2$ *) c	$MgSO_4$
I	Control		2.1	9.2	0.6	2.1	—	2.6	2.9	—	—	1.6
	0.153 gr. NaCl	1/50	2.1	—	0.6	2.1	—	2.7	2.9	—	—	1.5
	0.186 gr. Na_2SO_4	1/50	2.1	—	0.6	2.1	—	2.6	2.9	—	—	1.6
	0.314 gr. NaH_2PO_4	3/50	4.1	—	0.7	2.1	2.7	2.6	3.3	3.3	-	1.6
	0.145 gr. $CaCl_2$	1/50	2.6	—	0.6	2.0	2.1	2.5	2.9	2.8	—	1.6
	0.178 gr. $CaSO_4$	1/50	2.5	—	0.6	2.1	2.2	2.5	2.8	2.9	—	1.6
	0.124 gr. $MgCl_2$	1/50	2.4	—	0.6	2.0	2.1	2.5	2.9	2.9	—	1.6
	0.157 gr. $MgSO_4$	1/50	2.1	—	0.6	2.1	—	2.7	2.8	—	—	1.6
II	Control		2.3	9.9	0.6	2.2	—	2.6	3.1	—	—	1.7
	0.105 gr. NaOH	1/50	0.6	—	0.6	3.0	2.2	2.6	3.1	3.0	—	1.7
	0.097 gr. $Ca(OH)_2$	1/50	0.7	—	0.6	2.9	2.2	2.6	3.1	3.1	-	1.7
	0.191 gr. $Mg(HCO_3)_2$	1/50	1.7	—	0.6	2.7	2.3	2.6	3.1	3.1	-	1.6
	0.095 gr. HCl	1/50	4.3	—	0.6	1.4	2.1	2.6	3.0	3.0	-	1.6
	0.128 gr. H_2SO_4	1/50	4.3	—	0.6	1.5	2.1	2.6	3.1	3.0	—	1.6
	0.371 gr. Na_2HPO_4	3/50	2.1	—	0.7	2.8	2.8	2.6	3.6	3.5	3.5	1.6
	0.429 gr. Na_3PO_4	3/50	0.3	—	0.7	3.6	2.8	2.7	3.7	3.3	3.3	1.6

*) Precipitation *a* took place in wort of the acidity found.
Precipitation *b* took place in wort which by addition of n/10 HCl or n/10 NaOH had been given the same acidity as that of control sample.
Precipitation *c*: Same medium as *b*. The precipitate was evaporated with 0.5 gr. MgO on water bath, almost to dryness, and then burned by Kjeldahl's method, and so forth.

phate causes more nitrogen to be precipitated both by mercuric chloride and by uranium acetate than would answer to the proteïd individuals present, has been mentioned in the two memoirs which I have just cited; but how to avoid the error, and in what manner it comes about, is not known. As a perfect elucidation of this question demands a particular series of experiments, I have for the present let it rest and will confine myself to state the salt effect of phosphates in the course of the mashing process, with the reservation required: the precipitations by mercuric chloride and uranium acetate give too high results. It

is to be observed, however, that the phosphate experiments give nevertheless fairly ample information, the proportions of total soluble nitrogen and nitrogen in the form of albumine I, denucleïne and ammonia not being influenced at all by the precipitation errors in question[1]). But enough of that for the present.

As it appears from the Table X and the following Tables appertaining to this series of experiments, each experiment comprises four mashings, one of which is a control mashing (that is, one made with distilled water without any addition of acid, base or salt). We are thus enabled, in each experiment, to calculate the numeric value, positive or negative, of the salt effect, and these values the differences between salt experiment and control experiment may be linked together from experiment to experiment without the danger of committing errors greater than the analytical error.

To content ourselves with one control experiment for the whole of the experimental series would be wrong because of the large number of mashings. If, on the contrary, we make a control experiment for each mashing, then the numeric values of the salt effect will not be influenced by such slight anomalies as are inevitable in the course of each mashing, because the error thus produced is common to the whole experiment (all the four mashings being carried out simultaneously). Of course, this assertion only holds good if due care be taken that there is only a question of slight anomalies in the course of the mashing processes. For this purpose I have taken all possible measures. The scale of temperatures was the same in all the experiments, whilst the time it took to raise the temperature from 45° to 70° varied slightly, but never more than five minutes (minimum twenty-three, maximum twenty-eight minutes, average time twenty-five minutes). Seeing, however, that all the four mashings in the same experiment were subject to the same anomaly in regard to the time, it will not influence the difference between the salt experiment and the control experiment (the salt effect).

There is also another reason why it was necessary to make the just-mentioned arrangement: These experiments extended over a period of about ten months, and were all of them carried out with the same malt sample, which was at the end of storage

[1] Only the figures in brackets in Table X are too high.

(about six months, ground to a very fine powder. The whole malt sample was well mixed up and kept in a powder glass, which was tied with two layers of filter paper and placed in a dark and dry cupboard in the laboratory. The Table X shows that the degree of humidity of the meal was subject to considerable fluctuations. It is also possible that the transformations going on in the course of the mashing process may have been slightly influenced by storage; but this error, if it existed, may be avoided by means of the above arrangement and mode of judging.

A comparison between the fourteen control mashings will, however, show that the just mentioned sources of error have given rise only to very inconsiderable fluctuations in the transformations taking place in the course of mashing; and from what has been said above it appears that our interpretation figures will not be influenced at all by these fluctuations.

The analytical results are calculated in the manner and after the equations mentioned p. 240. But if we are to obtain absolute values of "Extract Yield" and "Soluble Ash Constituents", we must introduce corrections for the amount of salt added. If the malt meal contains v % of humidity, $400 + \frac{v}{2}$ gr. of mashing water will contain (s) gr. of "added" salt in the form of incineration residue (see p. 250). The value (s) can be readily calculated for each experiment. The salt correction for the extract value (k) is found from the following equation: $\frac{s \cdot 100}{400 + \frac{v}{2}} = \chi$. The salt correction for the amount of soluble mineral constituents can be calculated by the aid of this value (χ). In order to get the concentrated wort diluted to the extent that 100 cc. of dilute wort contain the extractive matters of 10 gr. hydrous malt, it will be necessary to dilute very nearly 88 gr.[1]) of concentrated wort to 100 cc. by addition of distilled water. Of this dilute wort 25 cc. is used for each determination of ashes. Consequently, this 25 cc. will contain "added" salt (in the form of incineration residue) corresponding with $\frac{88 \cdot \chi}{400}$ gr. The salt correction for the amount

[1]) The number fluctuates between 88.3 and 87.9 gr. In the experiment in which the mashing was made with $^3/_{50}$ gr.-equivalents of Na_3PO_4, the value 86.5 gr. was found exceptionally.

TABLE X.

Malt dry matter contains 1.74 % of total nitrogen and 2.36 % of total ash.

Experiment N°	Found for the value: Added to mashing water	1000 cc. of mashing water contains: — gr. of salt	gr.-equivalents of salt	pH measured in the mashing water before the experiment	v: The malt meal contains — %/oo: Water	Dry matter	k: %/oo of extract in the wort (Ball.): without salt correction	Salt correction	α: 25 cc. of dilute wort contains: gr. of soluble ash: without salt correction	Salt correction	β: Acid ∞ cc. of 1/10 norm. NaOH	γ: Nitrogen ∞ cc. of 1/10 norm. acid as: Total nitrogen	precipitable by: $BaCl_2$	$HgCl_2$	$FeCl_3$	$Pb(Ac)_2$	$MgSO_4$	titrable by formol	δ: 50 cc. of dilute wort contains nitrogen as ammonia ∞ cc. of 1/10 norm. acid	pH measured in dilute wort
I	Control			—	8.50	91.50	8.22	0	0.0323	0	2.5	10.6	1.1	3.1	3.8	4.8	2.8	3.4	0.4	6.1
	NaOH 0.20	1/200		—			8.17	0.01	0.0299	0.0017	2.0	10.3	1.2	3.1	3.8	4.6	2.9	3.2	0.4	6.2
	0.40	1/100		—			8.12	0.02	0.0279	0.0034	1.6	9.7	1.4	3.0	3.8	4.3	3.0	3.1	0.4	6.5
	0.80	1/50		—			7.39	0.03		0.0068	0.9	10.0	2.9	4.0	4.8	5.2	3.8	2.7	0.4	6.9
II	Control			—	8.56	91.44	8.21	0	0.0322	0	2.6	10.4	1.3	3.2	3.8	5.1	2.8	3.3	0.4	6.1
	$Ca(OH)_2$ 0.19	1/200		—			8.15	0.007	0.0270	0.0015	1.9	10.3	1.1	2.8	3.7	4.7	2.8	3.0		6.1
	0.37	1/100		—			8.08	0.015	0.0240	0.0030	1.4	9.7	1.1	2.5	3.7	4.3	2.8	2.8		6.2
	0.74	1/50		—			8.02	0.03	0.0222	0.0061	1.0	9.2	1.3	2.4	3.6	4.0	2.9	2.6	0.4	6.5
III	Control			—	8.50	91.50	8.21	0	0.0328	0	2.5	10.7	1.0	3.3	3.8	4.9	2.7	3.2	0.4	6.1
	$Mg(HCO_3)_2$ 0.37	1/200		—			8.17	0.005	0.0313	0.0011	2.0	10.5	1.1	3.0	3.8	4.8	2.8	3.2	0.4	6.1
	0.73	1/100		—			8.13	0.01	0.0269	0.0022	1.7	10.0	1.0	2.9	3.7	4.6	2.9	3.1	0.4	6.2
	1.46	1/50		—			8.08	0.02	0.0210	0.0044	1.0	9.8	1.3	2.8	3.6	4.3	3.0	3.0	0.4	6.4
IV	Control			—	8.50	91.50	8.22	0	0.0335	0	2.5	10.7	1.1	3.3	3.7	5.0	2.8	3.5	0.4	6.1
	HCl 0.18	1/200		—			8.28	0.01	0.0364	0.0020	2.9	11.7	0.9	3.4	3.8	5.4	2.8	3.7	0.4	6.0
	0.37	1/100		—			8.34	0.02	0.0374	0.0040	3.3	12.4	0.9	3.6	4.0	5.7	2.9	3.9	0.4	5.6
	0.73	1/50		—			8.23	0.04	0.0383	0.0079	4.0	12.7	0.9	3.2	3.9	5.6	2.7	4.1	0.4	5.3
V	Control			—	8.50	91.50	8.22	0	0.0313	0	2.7	10.7	1.1	3.3	3.7	5.1	2.8	3.4	0.3	6.1
	H_2SO_4 0.25	1/200		—			8.29	0.01	0.0346	0.0027	3.1	11.6	1.0	3.5	3.8	5.4	2.8	3.6	0.4	6.0
	0.49	1/100		—			8.35	0.02	0.0353	0.0053	3.7	12.5	1.0	3.8	3.8	5.8	2.9	3.8	0.3	5.5
	0.98	1/50		—			8.23	0.05	0.0366	0.0106	4.3	12.7	1.0	3.5	4.0	5.7	2.5	3.8	0.3	5.3
VI	Control			7.1	7.76	92.24	8.24	0	0.0307	0	2.3	10.9	1.0	3.5	3.9	4.7	2.8	2.8	0.4	6.1
	NaCl 0.58	1/100		6.2			8.32	0.03	0.0313	0.0066	2.3	11.0	1.0	3.5	4.0	4.9	2.8	3.0	-	6.1
	1.17	1/80		6.2			8.34	0.06	0.0380	0.0132	2.2	11.1	1.3	3.5	4.1	4.8	2.9	2.8	—	6.1

VII	Control			7.1	7.45	92.55	8.26	0	0.0307	0	2.3	10.8	0.9	3.3	3.9	4.6	2.8	3.2		6.1
	Na_2SO_4	0.35	1/200	6.4			8.34	0.02	0.0302	0.0044	2.3	11.0	0.9	3.5	4.0	4.8	2.8	3.3	0.3	6.1
		1.42	1/50	6.1			8.43	0.08	0.0329	0.0176	2.3	11.0	1.1	3.5	4.2	4.7	2.9	3.3	0.3	6.1
VIII	Control			7.1	8.87	91.13	8.18	0	—	—	2.4	11.0	1.1	3.2	3.8	4.9	2.8	3.3	0.4	6.1
	$CaCl_2$	0.28	1/200	5.2			8.19	0.01	—	—	2.4	11.2	1.0	3.3	3.8	5.0	2.7	3.3	0.4	6.0
		0.55	1/100	4.5			8.18	0.03	—	—	2.5	11.6	0.9	3.1	4.1	5.0	2.8	3.4	0.3	5.9
		1.11	1/50	3.8			8.24	0.06	—	—	2.5	12.4	1.2	3.2	4.2	5.2	2.8	3.4	0.4	5.7
IX	Control			7.1	8.62	91.38	8.19	0	0.0303	0	2.4	10.8	1.0	3.3	4.0	4.8	2.8	3.2	0.4	6.1
	$CaSO_4$	0.34	1/200	5.6			8.21	0.02	0.0304	0.0037	2.4	10.9	1.1	3.2	3.8	4.8	2.7	3.2	0.4	6.0
		0.68	1/100	5.6			8.23	0.03	0.0302	0.0075	2.4	11.5	1.0	3.2	4.2	5.1	2.7	3.4	0.4	5.9
		1.36	1/50	5.6			8.31	0.07	0.0285	0.0147	2.5	12.0	0.9	3.2	4.1	5.1	2.8	3.5	—	5.8
X	Control			7.1	8.31	91.69	8.20	0	0.0311	0	2.4	10.8	0.9	3.4	3.7	4.9	2.7	3.0	0.3	6.1
	$MgCl_2$	0.24	1/200	3.3			8.24	0.01	0.0326	0.0024	2.4	11.3	1.2	3.6	3.8	4.9	2.7	3.0	—	6.0
		0.48	1/100	2.8			8.27	0.02	—	—	2.5	11.6	1.0	3.5	3.8	5.1	2.7	3.1	0.3	5.9
		0.95	1/50	2.6			8.32	0.05	0.0363	0.0101	2.4	12.2	0.9	3.4	4.0	5.3	2.8	3.3	0.3	5.7
XI	Control			7.1	8.57	91.43	8.21	0	0.0315	0	2.3	10.9	1.0	3.3	3.7	4.8	2.7	3.1	0.4	6.1
	$MgSO_4$	0.30	1/200	5.6			8.24	0.02	0.0334	0.0033	2.3	11.2	0.9	3.3	3.9	4.9	2.7	3.3	0.4	6.0
		0.60	1/100	5.6			8.28	0.03	—	—	2.3	11.4	0.9	3.3	3.8	5.0	2.7	3.4	0.4	5.9
		1.20	1/50	5.5			8.35	0.06	0.0354	0.0131	2.4	11.6	1.0	3.4	4.1	5.1	2.8	3.6	0.3	5.8
XII	Control			7.1	8.31	91.69	8.20	0	0.0325	0	2.4	10.8	1.4	3.4	3.8	4.8	2.7	3.2	0.4	6.1
	Na_3PO_4	0.82	3/200	11.4			8.17	0.04	0.0361	0.0088	1.9	9.9	1.7	(3.7)	3.9	(4.6)	2.9	2.9	0.4	6.4
		1.64	3/100	11.7			7.73	0.08	0.0426	0.0176	1.5	9.7	2.3	(4.3)	4.3	(4.8)	3.3	2.7	0.5	6.8
		3.28	3/50	12.0			6.51	0.16	—	—	0.9	8.8	2.4	—	—	(4.6)	—	—	—	7.2
XIII	Control			7.1	8.37	91.63	8.19	0	0.0312	0	2.4	10.7	1.0	3.4	3.6	4.8	2.7	3.1	0.4	6.1
	Na_2HPO_4	0.71	3/200	8.2			8.21	0.03	—	—	2.3	10.3	1.6	(3.5)	3.7	(4.7)	2.8	3.0	0.4	6.3
		1.42	3/100	8.5			8.23	0.07	0.0415	0.0145	2.3	9.9	1.7	(3.7)	3.7	(4.7)	3.0	3.0	0.4	6.6
		2.84	3/50	8.7			8.07	0.13	0.0538	0.0290	2.3	9.7	2.1	(4.1)	4.1	(4.8)	3.1	3.0	0.4	6.8
XIV	Control			7.1	8.50	91.50	8.22	0	0.0318	0	2.4	10.7	1.0	3.4	4.0	4.8	2.7	3.4	0.4	6.0
	NaH_2PO_4	0.60	3/200	5.1			8.27	0.03	—	—	2.8	11.1	1.1	3.5	4.0	(5.1)	2.8	3.3	0.4	6.0
		1.20	3/100	5.1			8.34	0.05	0.0445	0.0111	3.3	11.2	1.4	3.5	4.0	(5.3)	2.8	3.3	0.4	5.9
		2.40	3/50	4.7			8.44	0.10	0.0540	0.0222	4.1	11.5	1.6	3.7	4.4	(5.5)	2.8	3.3	0.3	5.8

of soluble mineral constituents (y) will then be $\frac{22 \cdot \chi}{100}$ gr. These two corrections are calculated for each mashing and are given in Table X under x and y.

Wort Boiling.

These experiments were made with different samples of unhopped wort, prepared after the decoction mashing method, the final temperature being 70°. Accordingly, the original material had in no case been heated to a greater temperature than 70°, and had not been in contact with hops. As the unhopped wort employed usually contained some 18 % of extract, I diluted it with so much distilled water that the amount of extract was only 13—15 %. The dilute wort was shaken well up with a suitable amount of toluene and filtered through two layers of dry filter paper, after which the more or less clear filtrate was used as standard wort in every case in the following series of experiments.

The boiling was effected on a sand-bath in suitable flasks (1 l.), which were fitted with India-rubber stoppers provided with two perforations, in one of which was placed an Allihn's condensation apparatus, kept cold throughout the course of the experiment, and a thermometer with its ball just immersed below the surface of the wort. The upper end of the cooling pipe was closed with a not too tight-fitting glass cap.

For each experiment was used 300 cc. of standard wort containing 13—15 % of extract. Whenever the boiling was made with hops, the normal quantity of hops used was 2 gr. to 300 cc. of standard wort.

Before starting the experiment, I weighed the flask with contents, and after terminating the experiment and cooling the wort down to 15°, I made up the weight to its exact original amount by adding distilled water. The evaporation in the course of the experimental boiling averaged one gr. Finally, the boiled wort was filtered through two layers of dry filter paper. The 100 cc. which had been first filtered off was poured back on the filter.

The analytical examination of the wort samples was effected in exactly the same manner as described when treating of the

mashing experiments (pp. 238—239). For each determination I used 20 cc. of wort, except for the estimate of nitrogen in the form of ammonia, in which case 50 cc. was employed.

The results are calculated on 1000 cc. of wort by the following equations: —

Specific gravity $\times$ k $\times$ 10 = gr. of extract in 1000 cc. of wort.

$\alpha \times 50$ = gr. of ash in 1000 cc. of wort.

$\beta \times 5$ = acid in 1000 cc. of wort $\backsim$ — n. NaOH.

$\gamma \times 0.07$ = gr. of nitrogen in 1000 cc. of wort (in each determination of proteïd).

$\delta \times 0.028$ = gr. of nitrogen in 1000 cc. of wort in the form of ammonia.

It is evident that the boiling of wort with hops necessitates corrections for the quantities of substances — of the various groups — given out by the hops boiled, if indeed the effect exerted by these upon the bodies existing in the wort itself is to be ascertained. In order to determine the numerical value of these corrections, I boiled the various kinds of hops with distilled water in the same proportion and under the same conditions as in the principal experiments, because I think it may then be taken for granted that the quantities extracted from the hops will be approximately equal to those obtained when wort is used as solvent (or experimental liquid). As a matter of course we cannot be positive that the corrections thus found will be in perfect accordance with fact; but we are unable to get nearer the truth, the more so because in weighing out so small quantities of hops (2 gr.) it is impossible to obtain real average samples of the different hops used. We must therefore always acknowledge an inaccuracy in this point, and that an inaccuracy which it has not been possible to get over. I have tried in different manners to pulverise or finely grate the hops, but have found myself compelled to abide by the natural hop.

It is to be observed that these decoctions of hops were all of them quite turbid (from tannins and resins), and that the mercury precipitation did not in any case give a clear filtrate. The fact that this precipitation, even after as many as ten refiltrations, continued to give a turbid filtrate, is due to the presence of tannins, resins and soluble (acid) phosphates.

Table XI contains the corrections found for the proper effect of the hops, which corrections must necessarily be taken count

TABLE XI.

Found for the value					α	β	γ						δ		k
300 cc. of distilled water boiled					20 cc. of solution contains								50 cc. of solution contains nitrogen ∾ cc. of 1/10 norm. acid as ammonia	pH	% of extract (Ball.)
with		for	at	in	gr. of ash	Acid ∾ cc. of 1/10 n. NaOH	Nitrogen ∾ cc. of 1/10 norm. acid as								
							Total nitrogen	precipitable by							
Hops	— gr. of hops	— hours	temperature	an atmosphere of				$SnCl_2$	$HgCl_2$	$FeAc_3$	$UrAc_2$	$MgSO_4$			
Saaz	2	1/2	100°	Atmospheric air	0.0045	0.5	0.7	0	0	0.1	0.1	0	—	—	—
		1			0.0047	0.5	0.7	0	0	0.1	0.1	0	0.2	5.0	0.15
		2			—	0.5	0.7	0	0	0.1	0.1	0	0.2	—	—
		3			0.0057	0.5	0.8	0	0	0.1	0.1	0	0.2	5.0	0.22
		4			0.0042	0.5	0.9	0	0	0.1	0.1	0	0.2	4.7	0.18
		7			0.0053	0.5	0.6	0	0	0.1	0.1	0	0.2	4.6	0.17
		18			0.0059	0.5	0.7	0	0	0.1	0.1	0	0.2	4.7	0.18
	0.5	3			0.0015	0.1	0.2	0	0	0	0	0	0	6.0	0.06
	2.0				0.0057	0.5	0.8	0	0	0.1	0.1	0	0.2	5.0	0.22
	4.0				0.0115	1.0	1.6	0	0	0.2	0.2	0	0.3	4.9	0.46
	6.0				0.0175	1.6	2.1	0	0	0.3	0.3	0	0.4	4.4	0.62
English	2	3	100°	Atmospheric air	0.0047	0.4	1.0	0	0	0.2	0.1	0	0.1	5.0	0.19
Holledaur					0.0043	0.5	0.6	0	0	0.1	0.1	0	0.2	4.9	0.20
Stored country hops (second class)					0.0059	0.5	0.6	0	0	0.1	0.1	0	0	5.0	0.20
Moravia (first class)					0.0046	0.4	0.8	0	0	0.1	0.1	0	0.2	4.9	0.20
Bavaria (first class)					0.0075	0.6	1.0	0	0	0.2	0.1	0	0.2	4.9	0.25
Saaz (first class)			76°		0.0085	0.5	0.8	0	0	0.1	0.1	0	0.2	4.9	0.22
					0.0079	0.5	0.7	0	0	0.1	0.1	0	0.2	5.0	0.17
			109°		0.0087	0.5	0.8	0	0	0.2	0.1	0	0.2	4.9	0.23
			100°	Oxygen		0.5	0.8	0	0	0.1	0.1	0	0.2	4.9	—
				Hydrogen	—	0.5	0.8	0	0	0.1	0.1	0	0.2	4.7	—

of in the calculation of the results of the hop boiling experiments, if indeed we wish to disclose the effect exerted by the hops on the wort itself.

IX. Series of Experiments. Influence of the Duration of Boiling.

The boiling was effected in the exact manner previously described. Generally, I made two parallel series of experiments with the same standard wort, namely one without and one with hops (2 gr. to 300 cc. of wort). The experiments were made with six different worts, of which only two will be mentioned here, because the principal experiments were made with them; the other four experiments were only supplementary and consequently less comprehensive, being, however, in their fundamental lines similar to the principal experiments. Further particulars are given in Table XII, which contains the analytical numbers.

X. Series of Experiments. Influence of Hop Quantity.

300 cc. of standard wort was boiled in the usual manner for three hours with 0—0.5—2—4—6 gr. of hops (Saaz). At the completion of the boiling the worts were cooled, filtered and analysed in the manner described above. The analytical numbers are exhibited in Table XIII.

XI. Series of Experiments. Influence of Temperature or Pressure during Boiling.

300 cc. of standard wort was boiled three hours in the usual manner. In order to lower the boiling temperature, the upper end of Allihn's condensation apparatus was conveniently put in connection with a water air pump, and to raise the temperature the apparatus was by means of a doubly bent glass tube connected with a larger, two-necked Wulf's bottle, the other tube of which was likewise provided with a doubly bent glass tube, the free branch of the latter being so long that, by placing it in a high cylinder glass filled with a sufficient amount of mercury, it was rendered possible to produce the right pressure in the flask simply because the air in it expands in consequence of the heating.

Two different samples of standard wort were used. The

TABLE XII.

Analytical figures without hop corrections.

Standard wort	Found for the value: 300 cc. of standard wort boiled with — gr. of hops	for — hours	k: gr. of extract in 100 gr. of wort Ball.	α: gr. of ash	β: Acid ∞ cc. of 1/10 norm. NaOH	γ: 20 cc. of wort contains: Nitrogen ∞ cc. of 1/10 norm. acid as: Total nitrogen	γ: precipitable by: $SnCl_2$	$HgCl_2$	FeAc₃	$UrAc_2$	$MgSO_4$	δ: 50 cc. of wort contains nitrogen ∞ cc. of 1/10 norm. acid as ammonia	pH
I	Standard wort		15.35	0.0491	3.6	17.6	2.0	5.2	5.3	7.1	3.7	1.4	—
	0	1/2	—	0.0497	3.6	17.6	1.6	4.6	5.0	6.7	3.4	1.7	—
		1	15.35	—	3.6	17.7	1.6	4.5	5.0	6.7	3.3	—	—
		2		—	3.6	—	1.3	4.3	4.5	6.2	3.1	—	—
		4	15.31	0.0490	3.8	17.7	1.1	4.0	4.3	5.8	2.9	1.9	—
	2 (Saaz)	1/2	—	0.0520	4.2	17.7	1.4	4.1	4.3	6.0	2.8	1.7	—
		1	15.49	—	4.2	17.6	1.2	3.9	4.0	5.8	2.6	—	—
		2	—	—	4.2	17.3	1.0	3.7	3.9	5.7	2.5	1.8	—
		4	—	0.0536	4.4	17.1	0.9	3.5	3.7	5.1	2.3	2.0	—
II	Standard wort		14.08	0.0431	3.3	17.2	1.7	4.5	5.3	6.4	3.6	1.4	6.0
	0	1	14.06	0.0432	3.3	16.8	1.1	3.7	—	5.7	3.0	1.7	5.8
		4	13.98	0.0423	3.5	16.4	0.8	3.4	4.2	4.9	2.7	1.9	5.6
		7	14.02	0.0421	3.8	16.4	1.0	3.4	4.1	4.9	2.7	2.2	—
		18	13.95	0.0418	4.7	16.4	1.2	3.4	4.1	4.6	2.8	2.4	—
	2 (Saaz)	1	14.22	—	3.9	16.4	1.0	3.4	3.9	5.1	2.5	1.8	5.6
		4	14.26	0.0482	4.1	16.2	0.9	3.1	3.6	4.7	2.4	2.0	5.4
		7	14.25	0.0493	4.4	16.2	0.9	3.0	3.8	4.6	2.3	2.1	—
		18	14.18	0.0482	5.2	16.4	1.0	3.0	3.7	4.4	2.3	2.5	—

The hop corrections are given on p. 258, Table XI.

one was boiled at 78°, 101° and 109° without hops, the other at 76°, 101° and 109° with hops Saaz, first-class). The analytical numbers are shown in Table XIV.

XII. Series of Experiments. Influence of Concentration of Wort.

The standard wort was diluted with 0—1/2—1 volume of distilled water. The resulting three samples were boiled three hours as usual, both without hops and after addition of

TABLE XIII.

Analytical figures without hop corrections.

Found for the value	k	α	β	γ						δ	
300 cc. of standard wort boiled for three hours with — gr. of hops	gr. of extract in 100 gr. of wort (Ball.)	20 cc. of wort contains: gr. of ash	Acid ≙ cc. of $^1/_{10}$ norm. NaOH	Nitrogen ∞ cc. of $^1/_{10}$ norm. acid: Total nitrogen	precipitable by: $SnCl_2$	$HgCl_2$	$FeAc_3$	$UrAc_2$	$MgSO_4$	50 cc. of wort contains nitrogen ∞ cc. of $^1/_{10}$ norm. acid as ammonia	pH·
Wort, unboiled	13.77	0.0423	3.2	16.6	1.7	4.7	5.3	6.2	3.5	1.3	6.0
0	13.78	0.0424	3.4	16.0	1.0	3.5	4.2	5.1	2.6	1.7	5.8
0.5	13.79	0.0450	3.5	15.8	0.8	3.3	4.2	4.8	2.5	1.7	5.8
2.0	13.95	0.0494	3.9	16.0	0.8	3.2	3.5	4.6	2.2	1.9	5.6
4.0	14.10	0.0522	4.5	16.4	0.8	3.1	3.5	4.6	2.2	2.0	5.4
6.0	14.24	0.0587	5.0	16.4	0.8	3.0	3.5	4.3	1.9	2.1	5.1

The hop corrections are given on p. 258, Table XI.

TABLE XIV.

Analytical figures without hop corrections.

Found for the value			k	α	β	γ						δ	
300 cc. of standard wort boiled for three hours						20 cc. of wort contains							
with — gr. of hops	at pressure ≙ about m.m. Hg.	temperature in the liquid	gr. of extract in 100 gr. of wort (Ball.)	gr. of ash	Acid ≙ cc. of $^1/_{10}$ norm. NaOH	Nitrogen ∞ cc. of $^1/_{10}$ norm. acid as: Total nitrogen	precipitable by: $SnCl_2$	$HgCl_2$	$FeAc_3$	$UrAc_2$	$MgSO_4$	50 cc. of wort contains nitrogen ∞ cc. of $^1/_{10}$ norm. acid as ammonia	pH·
0		Wort, unboiled	13.64	0.0419	3.5	17.4	1.7	4.7	4.9	6.4	3.6	1.5	5.8
	230	78°	13.64	0.0414	3.5	17.2	1.4	4.3	4.6	5.9	3.3	1.7	5.8
	760	101°	13.60	0.0406	3.6	16.8	1.0	3.6	4.0	5.3	2.8	1.9	5.6
	985	109°	13.59	0.0420	3.7	16.4	0.9	3.5	3.8	5.0	2.7	2.0	5.4
2 Saaz (first class)		Wort, unboiled	14.19	0.0414	3.6	17.4	1.7	4.7	5.0	6.8	3.6	1.5	5.9
	250	76°	14.34	0.0502	4.2	17.8	1.2	3.9	4.0	5.9	2.7	1.7	5.7
	760	101°	14.34	0.0503	4.4	16.8	0.8	3.1	3.8	5.0	2.3	2.0	5.6
	970	109°	14.40	0.0514	4.5	17.4	0.9	3.2	3.9	5.1	2.5	2.2	5.5

The hop corrections are given on p. 258, Table XI.

2 gr. of hops (Saaz) to each 300 cc. of the original standard wort. Thus, the ratio of hops to extract was identical in all three experiments. For the analytical numbers see Table XV.

TABLE XV.

Analytical figures without hop corrections.

Found for the value		k	α	β	γ						δ	cc. of wort employed for the estimates	
300 cc. of standard wort boiled for 3 hours			The wort contains										
					Nitrogen ∞ cc. of 1/10 norm. acid as								
mixed up with — cc. of distilled water	with gr. of hops	gr. of extract in 100 gr. of wort (Ball.)	gr. of ash	Acid ∞ cc. of 1/10 norm. NaOH	Total nitrogen	precipitable by					ammonia	α, β and γ	δ
						$SnCl_2$	$HgCl_2$	$FeAc_3$	$UrAc_2$	$MgSO_4$			
Standard Wort, unboiled		15.11	0.0470	3.6	17.8	1.7	5.1	5.7	7.1	3.8	1.4	20	50
0	0	15.11	0.0473	3.8	17.4	1.0	3.9	4.3	5.4	2.9	—	20	50
150	0	10.24	0.0480	3.6	17.2	1.0	3.8	4.4	5.6	2.8	1.9	30	75
300	0	7.76	0.0450	3.6	17.4	1.0	3.6	4.4	5.4	2.8	1.8	40	100
0	2 (Saaz)	15.11	0.0520	4.4	17.4	0.8	3.5	4.9	5.1	2.5	1.9	20	50
150	2 (Saaz)	10.24	0.0520	4.2	17.2	0.8	3.5	4.4	5.0	2.3	2.0	30	75
300	2 (Saaz)	7.76	0.0528	4.1	17.4	0.8	3.5	3.9	5.2	2.4	2.0	40	100

The hop corrections are given on p. 258, Table XI.

As in regard to the dilution of the standard wort I have not made it a point to adhere strictly to the above ratio of wort to distilled water, and as the possibility is not precluded that a contraction may take place in consequence of this dilution, I have not ventured to calculate the results of these experiments with regard to the unity 1000 cc. of standard wort, but I have preferred to calculate them with regard to 100 gr. of extract, that is, 100 gr. of extract in unboiled wort of the particular dilution concerned. By means of k and the corresponding specific gravity it can be easily calculated, how many gr. of extract were contained in the quantities of wort drawn off for the different determinations. The worts measured for the determinations α, β and γ constantly contained 3.2 gr., and those measured for δ contained 8.0 gr. of extract. Consequently, 100 gr. of extract will contain $\frac{\alpha \cdot 100}{3.2}$ gr. of ash, $\frac{\beta \cdot 10}{3.2}$ of acid ∞ — cc. of norm. NaOH,

$\frac{\gamma \times 1.4}{32}$ gr. of nitrogen in each determination of proteïd, and $\frac{\delta \times 1.4}{80}$ gr. of nitrogen in the form of ammonia.

TABLE XVI.

Analytical figures without hop corrections.

Found for the value		k	α	β	γ						δ	
300 cc. of standard wort boiled for three hours			20 cc. of wort contains									
					Nitrogen ∞ cc. of $^1/_{10}$ norm. acid as							
						precipitable by						
with — gr. of hops	in an atmosphere of	gr. of extract in 100 gr. of wort (Ball.)	gr. of ash	Acid ∞ cc. of $^1/_{10}$ norm. NaOH	Total nitrogen	$SnCl_2$	$HgCl_2$	$FeAc_3$	$UrAc_2$	$MgSO_4$	50 cc. of wort contains nitrogen ∞ cc. of $^1/_{10}$ norm. acid as ammonia	PH
Wort, unboiled		13.99	0.0437	3.7	18.0	1.8	4.7	4.9	6.9	3.5	1.6	6.0
0	Air	—	0.0422	3.8	17.2	1.0	3.9	4.1	5.7	2.9	2.0	5.9
	Hydrogen	—	0.0429	3.8	17.2	1.1	3.8	3.8	5.6	3.0	2.0	5.9
	Oxygen	—	0.0392	3.9	16.8	1.0	3.8	3.9	5.7	2.9	2.0	5.9
2 Saaz (first class)	Air	—	—	4.6	17.2	0.8	3.3	3.6	5.3	2.4	2.1	5.8
	Hydrogen	—	—	4.5	17.2	0.8	3.3	3.6	5.2	2.3	2.1	5.8
	Oxygen	—	—	4.5	16.8	0.8	3.4	3.4	5.2	2.3	2.1	5.8

The hop corrections are given on p. 258, Table XI.

XIII. Series of Experiments. Boiling in Air, Oxygen or Hydrogen

300 cc. of standard wort was boiled for three hours without or with 2 gr. of hops (Saaz, first class). The boiling was made either in the usual manner, without supply of any gas (consequently in atmospheric air), or in an atmosphere of pure oxygen or pure hydrogen. In the latter two cases the flask, before the heating was commenced, was filled with the particular gas concerned, and during the time of boiling and cooling a weak current of oxygen or hydrogen was continually conducted through the flask. The air was supplied in such a manner as not to bubble up through the wort, but to pass over the surface of the liquid. Table XVI sets forth the numerical results.

XIV. Series of Experiments. Influence of the Kind of Hops.

300 cc. of standard wort was boiled three hours in the usual manner with 2 gr. of hops. At the completion of the boiling, the wort was cooled and made up to the original weight, and so forth, as mentioned before. For the results, see Table XVII.

TABLE XVII.

Anatytical figures without hop corrections.

Found for the value	k	α	β	γ						δ	
300 cc of standard wort boiled for three hours with 2 gr. of hops	gr. of extract in 100 gr of wort (Ball.)	20 cc. of wort contains: gr. of ash	Acid = cc. of 1/10 norm. NaOH	Nitrogen = cc. of 1/10 norm. acid as: Total nitrogen	precipitable by: $SnCl_2$	$HgCl_2$	$FeAc_3$	$UrAc_2$	$MgSO_4$	50 cc. of wort contains nitrogen = cc. of 1/10 norm. acid as ammonia	PH·
Standard wort, unboiled	14.24	0.0431	3.5	17.6	1.5	4.6	4.9	6.5	3.5	1.4	6.0
Saaz (first class)	14.38	0.0498	4.5	16.8	0.6	3.1	3.7	4.8	2.4	2.0	5.6
Bavaria (first class)	14.40	0.0474	4.5	16.6	0.6	3.2	3.5	4.9	2.3	2.0	5.6
Moravia (first class)	14.38	0.0480	4.5	16.6	0.6	3.2	3.6	4.8	2.3	2.0	5.6
Stored country hops (second class)	14.33	0.0485	4.4	16.6	0.6	3.2	3.6	4.9	2.2	1.9	5.6
Holledaur	14.38	0.0497	4.4	16.6	0.7	3.1	3.4	4.9	2.2	2.0	5.6
English	14.36	0.0461	4.4	16.6	0.7	3.3	3.5	5.1	2.3	2.0	5.6

The hop corrections are given on p. 258, Table XI.

Fermentation.

The fermentation experiments were made with pure seed cultures of various organisms, which had previously been revived in wort for three or four days. The cultures were furnished by the Biological Section of Carlsberg Laboratory.

I desire to take this opportunity to offer my heartfelt thanks to Mr. A. Klöcker, of this Laboratory, for the obligingness with which he placed the required materials at my disposal and assisted me in making a good choice, and at the same time I tender my sincere thanks to Mr. V. Topp for the valuable assistance given me by preparing and testing the cultures.

As a fermentation medium I have generally used common

brewers' wort (from filter bags) containing about 13 % of extract. The wort was sterilised in the usual manner in some large Carlsberg cans. After the wort had been left to stand for some time, and after I had made sure that it was really sterile, a sufficient quantity was transferred to sterilised, especially equipped flasks made of Jena resistant glass and holding one litre each. The appearance of these is seen in Fig. 1.

Each flask was closed with a cotton-wool stopper (A) and tied over with two layers of blotting paper, the lateral tube (B) being closed with a piece of India-rubber tube provided with a glass stopper. It was about half-filled with sterilised wort, to which was then added an extremely minute dose of the organism concerned, which is most easily done by proceeding as follows: —

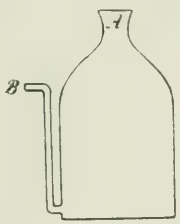


Fig. 1.
1/6 of its nat. size.

The revived culture (1/2 l. Pasteur flask) is shaken well up, and so much of it is transferred to a sterilised goblet that the height of liquid in the latter measures about 2 cm. By means of a sterilised platinum wire having a small eye at the end, the culture in the goblet is shaken well up, and the organisms attaching to the wire are transferred to the flask (through the neck, A) and absorbed in the wort. In this manner the flasks are infected with a minute and nearly identical number of organisms.

The precautionary measures necessary to prevent any foreign germs from slipping in were of course taken throughout the course of the experiment.

Two parallel series of experiments were undertaken with the same organism. The sterilised wort to be employed was always taken from one and the same Carlsberg can, because the amounts of extract of wort from different cans are never quite identical, even if these are filled with the same wort[1]).

In one of the parallel series the organism was allowed to develop without any particular supply of air, the flasks being left to stand in a closed cupboard, whilst in the other series atmospheric air was supplied during the whole course of the experiments. From a water air blower the atmospheric air was

[1]) The reason lies of course in the circumstance that the evaporation going on during sterilisation is not alike in all cans.

forced through a diluted solution of potassium permanganate, then through diluted potassium hydroxide, and at last it was made to rise through the liquid through the lateral tube, B). By the aid of a common screw-clip fixed on the piece of India-rubber tube that connects the lateral tube (B) with the discharge pipe of the potassium hydroxide washing apparatus, it is easy to conveniently regulate the air supply. At the beginning of the experiment, only 0.5—1 cc. of atmospheric air should be supplied per minute, as the liquid will otherwise foam so intensely that the bubbles will rise right up to the cotton-wool stopper (A). According as fermentation progresses, the formation of foam diminishing at the same time, more and more air may be supplied; yet I have never allowed the amount to exceed about 5 cc. of atmospheric air per minute. All the fermentations were conducted in the dark, at a temperature comprised between 15 and 17°, the experimental conditions being identical in the two parallel series, and even, as far as possible, in all the experiments.

In each double series of experiments eight fermentation flasks were generally employed, four of which were supplied with air, as described above, whilst the remaining four were left without access of air. By examining one flask of each series after a certain number of days, the transformations taking place in the fermenting liquid can be observed from time to time.

After the flasks have been infected with the organism concerned, they are placed one by one on a plain-table inclosed in a sterilised box, and the content is marked on the lateral tube of the flask, preferably by means of a small, tight-fitting India-rubber ring or a wax-pencil. At the close of the experiment the flask is again placed on the above-mentioned table, and distilled water is added to it in such quantity that the amount of liquid contained in it is equal to that at the beginning of the experiment. Finally, the content is analysed in the following manner: —

The flask is shaken so that all the organisms that have settled on the bottom become suspended in the liquid. While shaking continually, 20 cc. of the yeast suspension is then transferred by means of a pipette to a common combustion flask (Kjeldahl) holding 100 cc., where the yeast is employed to estimate the amount of assimilated nitrogen (nitrogen used up in the formation of yeast). For this purpose 5 cc. of normal sodium hydroxide and a suitable not too large) quantity of sus-

pended pure kaoline are added. After a few minutes' shaking at the normal temperature of the laboratory, by which means the albuminoids that have coagulated out are dissolved, the yeast (— kaoline) is collected on a common 11 cm. filter (Schleicher and Schull N° 589, washed with HCl and HF, in white band) in exactly the same manner as in an ordinary proteïd precipitation. The deposit and flask are washed first with distilled water, then with $^1/_{20}$ norm. hydrochloric acid (twice) — in order to dissolve and remove the ammonium phosphate of calcium and magnesium that may have been precipitated —, and, finally, once more with distilled water until no more chlorine can be found in the filtrate. After washing, the filter and yeast (+ kaoline) is transferred to the same flask in which the treatment with sodium hydroxide took place; 15 cc. of concentrated sulphuric acid is added and the operations continued by Kjeldahl's method. The filtering and washing manipulations take a good deal of time (one or two days); but by the procedure here described it is always possible to retain all the organisms on the filter, the pores of which are stopped up by the kaoline particles to such an extent that the cells cannot get through. A simple microscopical examination will show that the filtrate does not contain any organisms. As is the case in all proteïd precipitations, a correction for the nitrogen amount of the filter itself must be introduced — the amount contained in one filter is generally $\sim$ 0.2 cc. of $^1/_{10}$ norm. acid.

As regards the reliability of this determination, I may mention here that, just as by the aid of the microscope it can be ascertained that the filtrate does not contain organisms, so it will also be observed that proteïd solutions (wort and beer) in which coagulated albuminoids are suspended, immediately become limpid when sodium hydroxide is added in the above-mentioned proportion. There is, however, the danger that the sodium hydroxide may extract nitrogenous matters from the yeast-cell itself, so that the determination would be quite worthless. In order to convince myself of the non-existence of this danger, I undertook several series of determinations with the same yeast suspension, to 20 cc. of which I added throughout, as described above, increasing proportions of normal NaOH (from 0 cc. to 20 cc.) and a slight dose of suspended kaoline. I have not to enter into the details regarding these experiments, but

would only point out that albumin coagulates are completely dissolved on the addition of 3 cc. of norm. NaOH, and that the same nitrogen number is arrived at when 3 to 10 cc. of norm. NaOH is added. It is only when the proportion of this substance added to 20 cc. of suspended yeast exceeds 10 cc. that the nitrogen figure of the collected cells begins to decrease noticeably. If 5 cc. of norm. NaOH is added to 20 cc. of yeast, the nitrogen figure is also unaffected by the length of time during which the sodium hydroxide is allowed to exercise its action, unless that time exceeds 3 days. This should be sufficient to show that the above described modus operandi gives satisfactory results.

I have also tried to estimate the amount formed of dry substance of yeast by means of exactly the same method as just mentioned, only with this difference that the mixture of experimental liquid and sodium hydroxide did not receive an addition of kaoline powder. The organisms (yeast cells) were gathered on an 11 cm. filter (see above), which after washing with $^1/_{20}$ norm. hydrochloric acid was freed from chlorine by washing with distilled water, then washed with absolute alcohol and anhydrous ether, and finally dried two hours (in a weighing-glass) in vacuo at 95°, cooled in an exsiccator and weighed. The experimental liquid must first be poured back on the filter (re-filtered) several times before the organisms can be gathered. They were then washed with distilled water, $^1/_{20}$ norm. hydrochloric acid, again distilled water, absolute alcohol and anhydrous ether, after which they were dried in vacuo (2 hours at 95°) and cooled in the exsiccator. After weighing, the filter and yeast was transferred to the same combustion flask which was used in the treatment with sodium hydroxide, and after addition of 15 cc. of concentrated sulphuric acid the operation was continued after Kjeldahl's method. The filtration and washing take a great deal of time, often three or four days.

Up to this I have always been disappointed in my expectation to be able to estimate by this method the amount of yeast dry matter formed, and accordingly also the percentage of nitrogen contained in that matter. I constantly obtain very nearly the same nitrogen figure as by the kaoline method; but when I calculate the percentage of nitrogen in the dry matter of yeast, I generally find so great fluctuations within the same series of

experiments that I consider it advisable to set aside these determinations, which I have therefore not embodied in my tables. The nitrogen figures arrived at and the microscopical examination of the filtrate show that the yeast cells are really retained by the filter. The error must consequently be attributable to the determination of dry matter, and special experiments have shown that it is due to the circumstance that fibres come off from the filters in use, and that the latter contain substances which are dissolved by the dilute sodium hydroxide.

I have even met with instances in which the amount of dry matter was found to be negative, although the exact nitrogen figure was obtained. I should perhaps have succeeded if before using the filters I had washed them with sodium hydroxide; but I did not become aware of the error until I calculated the nitrogen percentage of the yeast dry matter for the various series of experiments, and that was too late. The reason why I mention this failure is only to warn other experimenters and save them unnecessary labour.

The remaining contents of the flasks should then be filtered through two layers of dry blotting paper. By repeated re-filtrations through the same, the organisms and the coagulated albumins can be removed, and the quite clear filtrate is then employed.

In the latter the amount of nitrogen is then estimated in the form of the various groups of proteïd individuals, ammonia and nitrogen titrable by formol, by the exact procedure described in the chapter on wort-boiling experiments (see p. 257), 20 cc. of filtrate being used in each estimation. The amount of ash in 20 cc. of filtrate is also determined in the previously described manner, whilst the concentration of hydrogen ions is measured in a mixture of 5 cc. of filtrate and an equal proportion of distilled water, because the change of colour cannot be observed on account of the intense colour of the undiluted liquid.

As the filtered liquid still contains carbonic acid in appreciable quantity, the acidity is estimated as follows: — 20 cc. of the filtered liquid is introduced into a flask of suitable size (100 cc.), which is closed with a stopper through which passes a long straight glass tube. The flask is placed in a water-bath maintained at a temperature of 50– 55° and warmed in the course of one hour up to about 50°, whilst being carefully shaken

TABLE XVIII.

Experiment No	Found for the value: The standard wort fermented at 15°—17°			100 cc. of experimental liquid contains — gr. of		α	β	γ: 20 cc. of experimental liquid contains									pH: measured in a mixture of 5 cc. of experimental liquid and 5 cc. of distilled water
	with		in — days	extract	alcohol	gr. of ash	Acid ∞ cc. of 1/10 norm. NaOH	Nitrogen ∞ cc. of 1/10 norm. acid as: yest assimilated	Total nitrogen	precipitable by: $SnCl_2$	$HgCl_2$	$FeAc_3$	$UrAc_2$	$MgSO_4$	ammonia	titrable by formol	
I	The standard wort itself			12.71	0	0.0404	4.0	0	15.0	0.8					0.8	5.7	5.4
	Saccharomyces Carlsbergensis	without air supply	4	12.52	0.10	0.0394	4.0	0.1	14.8	0.9	3.1	3.8	4.6	2.5	0.8	5.6	5.4
			11	6.21	3.37	0.0385	4.3	1.7	12.4	0.8	2.6	3.7	4.5	2.3	0.6	4.3	5.2
			18	4.60	4.07	0.0375	4.0	2.1	11.8	0.7	2.6	3.4	4.2	2.3	0.6	3.9	5.0
			29	4.45	3.95	0.0366	4.0	2.2	11.6	0.7	2.5	3.5	4.1	2.2	0.6	3.7	5.0
		with air supply	4	12.64	0.10	0.0409	4.0	0.1	14.8	0.9	3.1	3.8	4.6	2.5	0.8	5.6	5.4
			11	5.24	3.72	0.0379	4.5	2.6	11.0	0.7	2.3	3.7	4.1	2.3	0.3	3.9	5.2
			18	4.60	3.89	0.0367	4.4	2.6	11.0	0.7	2.4	3.4	3.9	2.2	0.4	3.3	4.6
			29	4.50	3.37	0.0364	4.6	2.9	10.8	0.7	2.2	3.4	3.9	2.0	0.4	3.2	4.6
II	The standard wort itself			12.83	0	0.0424	3.6	0	13.6	0.8	2.7	3.5	4.4	2.3	0.6	5.1	5.4
	Saccharomyces Pastorianus I	without air supply	5	—	0.81	0.0403	4.1	0.7	12.0	0.7	2.5	3.4	4.1	2.2	0.5	4.1	4.8
			12	7.29	2.83	0.0406	5.0	1.1	11.6	0.7	2.4	3.4	4.0	2.1	0.2	3.5	4.4
			19	5.25	3.83	0.0423	5.3	1.5	11.2	0.6	2.4	3.3	3.9	2.0	0.2	3.2	4.3
			26	4.88	3.77	0.0409	5.3	1.5	11.0	0.6	2.3	3.3	3.8	1.8	0.2	3.5	4.3
		with air supply	5	11.10	0.86	0.0402	4.1	0.9	11.8	0.6	2.4	3.4	4.0	2.1	0.4	3.8	4.8
			12	6.37	3.14	0.0396	5.0	1.5	10.8	0.6	2.2	3.3	3.8	2.0	0.2	3.2	4.4
			19	5.00	3.72	0.0396	5.4	1.7	10.8	0.6	2.2	3.3	3.7	2.0	0.1	2.8	4.2
			26	4.80	3.66	0.0402	5.5	1.7	10.6	0.5	2.1	3.3	3.6	1.8	0.1	3.2	4.2
III	The standard wort itself			13.24	0	0.0425	3.7	0	14.0	0.9	2.9	3.9	4.5	2.4	0.6	4.9	5.1
	Torula, B (Brettanomyces)	without air supply	6	13.22	0	0.0436	3.6	0	13.8	1.0	2.9	3.8	4.5	2.4	0.7	4.8	5.1
			16	11.99	0.68	0.0415	4.4	0.8	12.8	1.0	2.9	3.8	4.3	2.4	0.5	4.5	5.0
			26	11.69	0.76	—	4.8	0.9	12.6	0.9	2.9	3.6	4.1	2.2	0.5	4.4	4.7
			47	11.62	0.81	0.0421	5.3	0.9	12.6	1.0	3.0	3.5	4.2	2.2	0.4	4.4	4.7
		with air supply	6	13.21	0	0.0431	3.6	0.1	13.8	0.9	2.9	3.9	4.3	2.4	0.6	4.8	5.1
			16	11.87	0.63	0.0400	6.3	1.2	12.2	0.8	2.6	3.7	4.0	2.2	0.4	4.2	4.7
			26	11.24	0.81	—	9.0	1.4	12.0	0.8	2.7	3.6	3.9	2.2	0.4	4.1	4.4

IV	Saccharomyces apiculatus	without air supply	5	11.69	0.61	0.0430	4.5	0.5	12.4	0.7	2.3	3.1	3.7	1.8	0.6	4.3	4.7
			12	11.64	0.61	0.0408	4.5	0.5	12.4	0.7	2.3	3.0	3.8	1.8	0.6	4.4	4.6
			20	11.65	0.48	0.0402	5.4	0.6	12.2	0.7	2.0	2.7	3.5	1.7	0.7	4.3	4.5
			26	11.45	0.41	0.0413	6.0	0.6	12.0	0.7	2.0	2.8	3.4	1.5	0.7	4.4	4.5
		with air supply	5	11.60	0.56	0.0414	4.5	0.9	11.8	0.5	2.2	3.2	3.4	1.8	0.6	4.3	4.7
			12	11.60	—	0.0413	4.8	0.9	11.8	0.7	2.0	2.8	3.5	1.7	0.7	4.0	4.6
			20	11.64	0.41	0.0402	5.5	0.9	11.8	0.7	2.0	2.9	3.6	1.6	0.7	4.2	4.5
			26	11.54	0.31	0.0416	6.1	1.0	12.0	0.7	2.0	2.9	3.3	1.5	0.7	4.3	4.5
V	The standard wort itself			12.33	0	0.0412	3.4	0	12.8	1.0	2.7	3.4	3.9	2.0	0.5	4.6	5.2
	Monilia candida	without air supply	7	11.10	0.66	0.0396	3.7	0.6	12.0	0.7	2.7	3.4	3.8	1.9	0.5	4.0	5.0
			15	10.74	0.81	0.0366	4.0	0.6	11.8	0.6	2.6	3.2	3.9	1.9	0.5	4.0	4.8
			27	10.14	1.06	0.0360	4.3	0.6	11.8	0.4	2.5	3.2	3.8	1.6	0.5	4.0	4.8
		with air supply	7	8.56	—	0.0352	3.9	2.7	9.4	0.6	2.3	3.0	3.3	1.8	0.5	2.9	4.7
			15	6.99	—	—	5.0	3.0	9.2	0.4	2.0	3.0	3.3	1.6	0.5	2.8	4.2
			27	4.67	—	0.0358	6.1	3.1	8.8	0.3	1.8	2.7	3.1	1.4	0.3	2.8	4.2
VI	The nutrition liquid			12.26	0	0.0362	3.5	0	10.4	0	0	—[1]	0.2	0	0	5.4	4.7
	Saccharomyces Carlsbergensis	without air supply	6	12.28	0	0.0353	3.2	0	10.4	0	0	—	0.2	0	0.1	5.6	4.7
			13	12.30	Spor	0.0343	3.5	0	10.4	0	0	—	0.3	0	0	5.8	4.5
			24	12.45	0.15	0.0339	3.7	0	10.4	0	0	—	0.3	0	0	5.6	4.3
			32	12.50	0.21	0.0359	3.7	0	10.4	0	0	—	0.3	0	0	5.5	4.2
	Saccharomyces apiculatus	without air supply	6	12.28	0	0.0355	3.2	0	10.4	0	0	—	0.3	0	0.2	5.8	4.7
			13	12.33	0	0.0350	4.0	0	10.4	0	0	—	0.2	0	0	6.0	4.6
			24	12.40	0	0.0336	3.5	0	10.4	0	0	—	0.2	0	0	5.8	4.6
			32	12.45	0	0.0357	3.3	0	10.4	0	0	—	0.3	0	0	5.7	4.5

[1]) The reason why the ferriacetate precipitation is omitted lies in the fact that a little asparagin is precipitated at the same time. The determination here referred to may be left out without changing the result, because throughout the experiment it can be inferred with certainty that neither denuclein nor proteose is present, the precipitations by $HgCl_2$- and $MgSO_4$ giving invariably the figure 0.

from time to time. After the flask has been taken out of the water-bath, 20 cc. of distilled water is allowed to run in through the glass tube. After cooling, the 40 cc. of liquid contained in the flask receives an addition of 2 cc. of a 1 % solution of phenolphtaleine and is titrated with $^1/_{10}$ norm. sodium hydroxide to the colour of the control sample. The latter is in this case composed of 40 cc. of distilled water to which by addition of Bismarck brown and tropæolin O the same colour as the dilute experimental liquid has been imparted, 2 cc. of solution of phenolphtaleine and 4 cc. of Sørensen's solution of di-sodium phosphate $^1/_{15}$ mol.. By this means it becomes possible at all times to titrate to the same point.

The procedure by which the alcohol and extract were estimated was the following: — Exactly 100 cc. of the filtrated liquid was by means of distilled water poured into a distillation flask provided with a spiral platinum wire — to avoid bumping boiling — and a suitable upright tube with one or two bulbs blown upon it. The alcohol was distilled off and collected in the same flask that was employed in measuring the experimental liquid. To the distillate was added distilled water until the total volume attained 100 cc.; it was then shaken up well and cooled to about 13°. The specific gravity at 15° was determined by the aid of a pycnometer (about 50 cc., fitted with a thermometer and rising-pipe), and the corresponding percentage of alcohol (gr. of alcohol in 100 cc.) was calculated by means of Holzner's Tables. After cleansing the flask with distilled water, the extract remaining in the distillation flask was poured into it together with distilled water. The flask was filled up to the mark (100 cc.) with distilled water, carefully shaken and cooled to about 15°. Finally, the specific gravity was determined at 17.5°, and the corresponding extract percentage (gr. of extract in 100 cc.) calculated by Balling's Tables.

I may mention here that I have also undertaken a series of fermentation experiments with Saccharomyces Carlsbergensis and Saccharomyces apiculatus in a nutrient solution of 12 gr. of cane sugar, 0.4 gr. of asparagine, 0.1 gr. of mono-potassium phosphate (KH_2PO_4), 0.1 gr. of magnesium sulphate ($MgSO_4 + 7\,H_2O$), 0.1 gr. of sulphate of lime ($CaSO_4 + 2\,H_2O$) and 0.01 gr. of sodium chloride ($NaCl$) in 100 cc. of distilled water. This solution, after filtration and sterilising in a large Carlsberg can in

the usual manner, was made use of in exactly the same way as the sterilised wort samples. A considerable part of the cane sugar was inverted in sterilisation. Also in these experiments the analytical work was carried out exactly as described above, and gave the results brought together in Table XVIII, Experiment VI.

These were ultimately calculated in proportion to the unity 10,000 cc. of experimental liquid. The manner in which these calculations were made need no further explanation.

XV. Series of Experiments. The Principal Fermentation.

Fermentation experiments were made with the following organisms:

Saccharomyces Carlsbergensis.
Saccharomyces Pastorianus I.
Torula B (Brettanomyces)[1]).
Saccharomyces apiculatus.
Monilia candida.

The analytical figures are set forth in Table XVIII, which likewise contains the necessary information regarding the arrangement of the experiments.

XVI. Series of Experiments. Secondary Fermentation.

Several experiments were undertaken for the purpose of inquiring into the significance of Secondary Fermentation. Each set of these experiments was made with samples from one and the same cask. The principal fermentation was carried out with Saccharomyces Carlsbergensis. The results arrived at being essentially alike, I will here mention only two of these sets of experiments.

Table XIX gives the analytical figures and the necessary particulars as to the duration of the secondary fermentation.

3. Experimental Errors.

The experimental errors were determined by means of a particular series of experiments, in which 4×50 gr. of fine meal of the same malt sample were mashed exactly by the normal

[1]) Compt. rend. des travaux du Laborat. de Carlsb. **7**, 149 (1908).

TABLE XIX

Found for the value				α	β	γ								pH
Experiment N°	Stored at 2° for — days	100 cc. of experimental liquid contains — gr. of		20 cc. of experimental liquid contains										measured in a mixture of 5 cc. of experimental liquid and 5 cc. of distilled water
		extract	alcohol	gr. of ash	Acid ≙ cc. of 1/10 norm. NaOH	Nitrogen ≙ cc. of 1/10 norm. acid as								
						Total nitrogen	precipitable by					ammonia	titrable by formol	
							$SnCl_2$	$HgCl_2$	$FeAc_3$	$UrAc_2$	$MgSO_4$			
I	0	5.68	3.89	0.0399	4.8	8.4	0.6	2.1	2.7	3.1	1.6	0	2.2	4.4
	27	5.13	4.22	—	—	8.4	0.7	2.1	2.5	3.1	1.5	0	2.3	4.3
	38	5.13	4.21	0.0380	5.0	8.4	0.6	2.0	2.6	3.1	1.5	0	2.3	4.4
	91	5.00	4.25	0.0400	4.2	8.4	0.6	2.0	2.5	3.1	1.4	0	2.4	4.5
	120	4.95	4.31	0.0375	4.7	8.4	0.6	1.9	2.4	3.1	1.5	0	2.6	4.6
II	143	—	—	0.0446	6.8	7.9	0.6	1.9	2.6	3.1	1.5	—	—	—
	179	—	—	0.0439	6.2	7.9	0.5	1.8	2.5	3.2	1.4	—	—	—
	208	—	—	0.0439	5.1	8.0	0.5	1.8	2.5	3.2	1.5	—	—	—
	230	—	—	0.0440	4.6	8.0	0.5	1.8	2.5	3.2	1.5	—	—	—
	300	—	—	—	5.6	7.9	0.4	1.8	2.5	3.2	1.5	—	—	—
	321	—	—	0.0437	4.6	8.0	0.6	1.9	2.4	3.1	1.4	—	—	—

method. The four wort samples were examined entirely by the analytical method described above, 25 cc. of dilute wort being

TABLE XX.

100 gr. of malt dry matter contains 1.68 gr. of total nitrogen and 2.38 gr. of total ash.

Found for the value	v	b	k	α	β	γ							δ	
Experiment N°	Malt meal contains — % of		% of extract in the wort (Ball.)	25 cc. of dilute wort contains									50 cc. of dilute wort ≙ cc. of 1/10 norm. acid as ammonia	pH
	water	dry matter		gr. of soluble ash	Acid ≙ cc. of 1/10 norm. NaOH	Nitrogen ≙ cc. of 1/10 norm. acid as								
						Total nitrogen	precipitable by					titrable by formol		
							$SnCl_2$	$HgCl_2$	$FeAc_3$	$UrAc_2$	$MgSO_4$			
1	3.30	96.70	8.45	0.0310	2.5	11.4	0.9	3.0	3.8	4.5	2.4	3.0	0.4	6.0
2			8.46	0.0297	2.4	11.5	1.0	3.1	3.9	4.6	2.5	2.9	0.4	6.0
3			8.44	0.0306	2.5	11.4	0.9	3.0	3.7	4.4	2.4	3.0	0.4	6.0
4			8.46	0.0313	2.5	11.5	1.1	3.0	3.9	4.6	2.6	2.8	0.4	5.9

used for each determination, excepting that of nitrogen in the form of ammonia, where twice as much was employed.

The analytical figures are shown in Table XX.

From these figures I have calculated the ultimate results in proportion to the following four unities:

(I) Total amount of nitrogen in the malt.

(II) 100 gr. of extractive matter.

(III) 1000 cc. of wort.

(IV) 10,000 cc. of wort.

The greatest difference between the four experiments represents the experimental error to be taken into account in each particular case. These errors are brought together in Table XXI.

TABLE XXI.

Column marks	A	B	C	A_I	A_{II}	D	E	F	G	H	N	P	T	P + T	$A_I + A_{II}$	O
Analytical errors when the results are calculated for the unity	gr. of extract	gr. of ash	Acid ∞ cc. of norm. NaOH	gr. of nitrogen in the form of												
				Albumin		peptic decomposition products = P			tryptic decomposition products = T		soluble nitrogen	decomposition products			Albumin I and II	titrable by formol
				I	II	Denucleïn	Protease	Peptone	Ammonia	Amine-Amid		peptic	tryptic	proteolytic		
The total amount of nitrogen in malt meal	0.2[1])	0.06[1])	0.4[1])	0.7					0.4		0.4					0.7
100 gr. of extract	—	0.09	0.6	0.015					0.008		0.008					0.015
1000 cc. of wort	0.2	0.06	0.4	0.012					0.007		0.007					0.011
10,000 cc. of wort	2.0	0.6	4.0	0.12					0.07		0.07					0.11

As regards the measurement of the concentration of hydrogen ions according to S. P. L. Sørensen's colorimetric method, it was, generally, not attended with any difficulty. Only in very few cases — particularly in the wort and hop boiling experiments — the colour of the wort was so intense that the change of colour could not be observed. The exactness with which these determinations can be made may be best illustrated by some examples where the concentration of hydrogen ions was measured

[1]) Relating to 100 gr. of malt dry matter.

both electrometrically and colorimetrically. The electrometrical measurements were made by Mess. E. Jürgensen and S. Palitzsch, the colorimetrical ones by myself.

Wort sample	Exponent of Hydrogen Ions measured electrometrically by		colorimetrically
N.	Jürgensen	Palitzsch	
1	5.89		5.8
2	5.87		5.8
3	5.40		5.4
4	6.24		6.2
5	6.07		6.1
6	6.00		6.1
7		5.92	6.0
8		5.91	6.0
9		5.84	5.9
10		5.78	5.8

The concordance between these figures is pretty satisfactory; still it appears from them as well as from those arrived at before (see Table XX), that in colorimetrical measurement an experimental error (relating to p_H) of 0.1 must be reckoned with. The figures also show that I am rather inclined to read p_H a little too alcaline, thus arriving at a concentration of hydrogen ions a little lower than it really is.

I take this opportunity to render my sincerest thanks to Messieurs E. Jürgensen and S. Palitzsch for their obligingness in undertaking the above measurements.

4. Interpretation of Principal Experiments.

A. General Considerations on the Decomposition of the Proteïd Molecule into less complex Proteïd Individuals and Decomposition Products.

It is a well known fact that in the course of the malting and mashing processes the insoluble proteïd individuals existing in the barley grain are more or less transformed into soluble proteïd individuals with rather different properties. That this transformation consists in a decomposition of the original proteïd molecule, and that this decomposition results in a whole series

of different products, is just as certain as for example the fact that in hydrolytic decomposition polysaccharides are decomposed and gradually give less complex polysaccharides, disaccharides and monosaccharides.

Although we have not yet obtained sufficient insight into the way in which the more complex proteïd molecules are demolished, yet it is certainly possible to estimate at least the quantities of the various groups of demolition and decomposition products. In order to be enabled from the figures thus arrived at to calculate the extent or value of each transformation or decomposition, we must necessarily first know the consecutive order in which these processes take place. But in this respect we are still rather in the dark.

By the analytical method used in these as also in all my former researches we are enabled to estimate the quantities of the following transformation and decomposition products: — Albumin I, Albumin II, Denucleïn, Proteose or Albumose, Peptone, Amine-Amid and Ammonia. These seven terms can be very naturally and simply grouped in three well-defined stages of decomposition, namely: —

(I) Albumins soluble in water (A_I and A_{II});
(II) Peptic Decomposition products (Denucleïn + Proteose + Peptone);
(III) Tryptic Decomposition products (Amine-Amid + Ammonia).

It has not yet been ascertained whether these decomposition stages are to be considered as isolated terms that are independent of one another, or as a chain of successive transformations, or, finally, as a combination of both. But one thing is certain: — So long as there is a question of the transformation of proteïds in the course of the malting of barley and mashing of barley malt, the first-mentioned stage of decomposition cannot be looked upon as an isolated term, but must be considered to be continued by the stages II and III; for it is an established fact that the sum $A_I + A_{II}$ can increase up to a certain point of development, after which it may decrease, or conversely. If, therefore, the amount of proteïd insoluble in water is called Q, the conversion of proteïd in malting and mashing must necessarily take place in one of the following three ways: —

(I) $Q \longrightarrow (A_I + A_{II}) \longrightarrow$ { Peptic Decomposition prod. } $\longrightarrow$ { Tryptic Decomposition prod.

(II) $Q \longrightarrow (A_I + A_{II}) \rightleftharpoons$ Peptic Decomposition products. / Tryptic Decomposition products.

(III) $Q \longrightarrow (A_I + A_{II}) \rightleftharpoons$ Peptic Decomposition products. ! Tryptic Decomposition products.

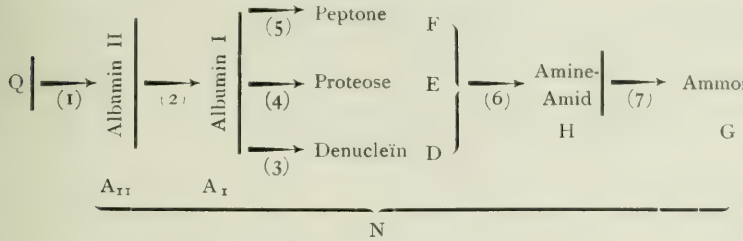
My previously published researches on the ripening of barley[1] have shown that the quantity of tryptic decomposition products decreases according as the ripening progresses, whereas the amount af corresponding peptic products increases. Thus, in the construction of the proteid molecule the peptic decomposition products form a connecting link; consequently, the demolition of the proteid molecule must likewise be supposed to pass through the stage of peptic decomposition products, seeing that we are throughout compelled to regard construction and demolition as entirely reverse or reciprocal processes.

The possibility designated as (II) may, according to what has just been said, be left quite out of consideration, as it will by no means answer to the course of the condensation, and, for the matter of that, not to the undermentioned mashing or decomposition phenomena either. Thus there only remain the two possibilities I and III. It is certainly not easy to choose between these either; but even here the condensation phenomena tell in favour of the first alternative, since it is not probable that some of the amine-amid combinations should be condensed direct to albumins (without going through any intermediate link), whilst others must pass through one or perhaps even several intermediate links to reach the albumin molecule; it is evidently more likely that all the amine-amid groups get through one or more intermediate stages before attaining to the ultimate condensation. It therefore seems to me to be not very hazarded to suppose that proteid conversion in malting and mashing proceeds, at least in the main features, according to (I).

It will be remembered that previous experiments[2] proved

[1] Compt. rend. des travaux du Laborat. de Carlsb. **6**, 229 (1906).
[2] Ibid. **8**, 282 (1910).

albumin II to be converted into albumin I in normal germination, whereas in over-germination albumin I is transformed into albumin II; further, that proteose is in all likelihood no condensation product at all[1]). Moreover, there can be no doubt whatever that peptone is less complex than any other of the peptic decomposition products. Accordingly, the proteïd transformation and decomposition occurring during the malting and mashing processes can be expressed as follows[2]): —



If Q, as mentioned above, means the amount of nitrogen in the form of insoluble proteïd substances, and the letters N, A_{II}, A_I, D, E, F, H and G the quantities of nitrogen in the form of soluble proteïd individuals and decomposition products, albumin II, albumin I, denucleïn, proteose, peptone, amine-amid and ammonia, respectively, — we are able to calculate the numerical values of the most important of the transformation processes marked by arrows and parenthetical numbers.

Process	Column mark in Tables
(1) = N = Proteïd Dissolution process	N
(2) = N ÷ A_{II} = Albumin Conversion process	N ÷ A_{II}
(3 + 4 + 5) = N ÷ (A_I + A_{II}) = Peptic action	P + T
(6) = H + G = Tryptic action	T
(7) = G = Ammonia separation process	G

[1]) Compt. rend. des travaux du Laborat. de Carlsb. **6**, 280 (1906).

[2]) In agreement not only with what is known in regard to the formation and demolition of proteïd substances, but also with the facts relating to precipitation: — Denucleïn is precipitated by sublimate, but cannot be salted out of a slightly acid liquid by means of magnesium sulphate. Proteose is salted out of a slightly acid liquid by magnesium sulphate, but is not precipitated by sublimate. Peptone is neither precipitated by sublimate nor salted out by magnesium sulphate. All three substances are precipitated by uranium acetate. The two albumins are precipitated both by sublimate and uranium acetate, and are also salted out of slightly acid liquid by magnesium sulphate.

Even if we know the proportions of denucleïn D, proteose E, and peptone F, the values of the three processes (3), (4) and (5) cannot be calculated, because we are quite in the dark as to the effect of the tryptase on each particular term, and because we do not even know with certainty whether the three peptic decomposition products do not in themselves represent two or perhaps even three stages in the peptic demolition process. The fact is that there is something that goes to show that albumln I is first decomposed by peptase into denuclein and proteose, which in their turn are split up by the continued action of the peptase into real peptones, which are finally acted upon by tryptase. Although, therefore, the analytical method used enables us to estimate the proportion of seven decomposition and transformation products, we can calculate only the numerical values of five transformation processes. Moreover, as we shall see later on, only four of these are of particular importance for our research.

We will now try to throw a bridge between my previous work (malting factors) and the first section of the present (mashing factors).

B. The Extent of Proteïd Decomposition in Malting and Mashing.

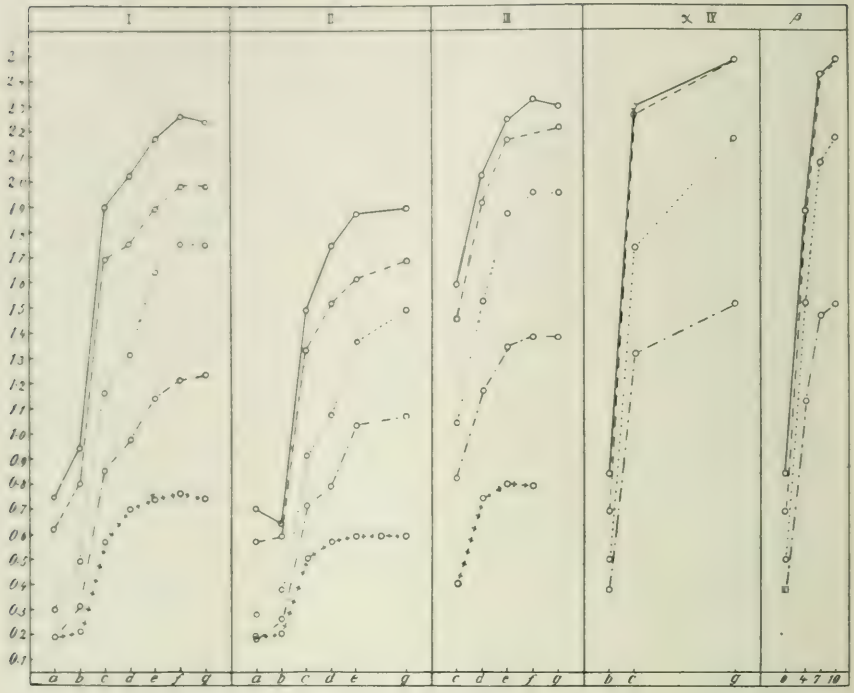
Referring to my first series of experiments (p. 240), it is to be observed that Experiment I (Table XXII) was made with a sample of barley of an inferior quality, whereas that used in the other three experiments left nothing to be desired. In Experiments I and III germination was conducted for eight days under altogether identical conditions, whilst Experiments II and IV differ in that germination lasted nine and ten days, respectively. The figures given under Experiment IV (α and β) result from one of my former malting experiments[1]).

As may be seen by Table XXII, the Experiments I and II show malt samples with rather an imperfect conversion of proteïd (this applies more particularly to the albumin conversion), whereas Experiment III exhibits a normal and nearly completed proteïd conversion, and Experiment IV α a malt with a normal and absolutely completed conversion. IV β gives a summary view of the progress of that conversion during germination (malting).

[1] Compt. rend. des travaux du Laborat. de Carlsb. **8**, 222 and 235 (1910). Tables XV and XXIV.

Experiment No	Mark	50 gr. of meal of	treated with 200 cc. of distilled water	Gr. of dry matter in 10,000 corns	A	B		C	A_I	A_{II}	D	E	F	G	H	N	$\frac{N}{A_{II}} \div \frac{P}{T}$	T	O	pH measured in the dilute wort	Gr. of total nitrogen in 10,000 corns	% of total nitrogen in dry matter
				10,000 corns contains												Numerical value of the processes, relating to 10,000 corns						
					gr. of extract	gr. of ash in the form of		Acid ≙ cc. of norm. NaOH	gr. of nitrogen in the form of													
						soluble combinations	insoluble combinations		Albumin		peptic decomposition products = P			tryptic decomposition prod. = T		Proteid dissolution	Albumin conversion	Peptic action	Tryptic action	Peptid splitting			
									I	II	Denuclein	Proteose	Peptone	Ammonia	Amine-Amid							
I	a	Barley	1 hour at 1°	401.7	28.08	3.54	—	13.3	0.32	0.13	0.06	0	0.05	0.01	0.18	0.75	0.62	0.30	0.19	0.19	6.1	6.91	1.75
	b	Steep		391.1	30.47	3.77	—	22.4	0.31	0.14	0.10	0.02	0.06	0	0.31	0.94	0.80	0.49	0.31	0.21	6.0	6.76	1.73
	c				78.32	2.62	—	21.1	0.53	0.21	0.15	0.08	0.08	0.04	0.81	1.90	1.69	1.16	0.85	0.57	6.1		
	d		20 minutes at 45°		96.92	4.08	—	27.1	0.44	0.27	0.15	0.05	0.14	0.04	0.93	2.02	1.75	1.31	0.97	0.70	6.1		
	e	Malt	+ up to 70°	359.1	270.33	4.70	—	33.1	0.25	0.28	0.21	0.08	0.21	0.04	1.10	2.17	1.89	1.64	1.14	0.74	6.1	6.01	1.67
	f		+ 1 hour at 70°		283.58	4.34	—	34.6	0.23	0.28	0.23	0.08	0.23	0.04	1.17	2.26	1.98	1.75	1.21	0.76	6.1		
	g		+ boiling		283.90	4.29	—	34.6	0.23	0.26	0.21	0.10	0.21	0.04	1.19	2.24	1.98	1.75	1.23	0.74	6.1		
II	a	Barley	1 hour at 1°	404.0	33.05	9.70		12.9	0.29	0.13	0.07	0	0.03	0.01	0.17	0.70	0.57	0.28	0.18	0.19	6.1	6.04	1.50
	b	Steep		395.3	21.62	2.49	6.56	11.9	0.21	0.05	0.07	0.05	0	0	0.26	0.64	0.59	0.38	0.26	0.20	6.0	5.95	1.51
	c				71.25	1.83	6.04	13.5	0.42	0.16	0.09	0.07	0.04	0.02	0.69	1.49	1.33	0.91	0.71	0.50	6.1		
	d	Malt	20 minutes at 45°		93.96	3.53	4.34	25.5	0.44	0.23	0.13	0.04	0.11	0.02	0.77	1.74	1.51	1.07	0.79	0.57	6.1		
	e		+ up to 70°	349.8	272.63	4.39	3.48	30.0	0.25	0.26	0.16	0.02	0.15	0.02	1.01	1.87	1.61	1.36	1.03	0.59	6.1	5.09	1.46
	g		+ 1 hour at 70° + boiling		280.57	4.37	3.50	30.0	0.19	0.21	0.19	0.06	0.17	0.02	1.05	1.89	1.68	1.49	1.07	0.59	6.1		
	Rootlets			18.2	9.9	1.03	0.11	6.0	0.02	0.01	0.04	0	0	0.05	0.33	0.45	0.44	0.42	0.38	0.26	6.6	0.85	4.68
III	c		1 hour at 1°		55.15	2.40	-	17.5	0.41	0.14	0.12	0.06	0.04	0.03	0.79	1.59	1.45	1.04	0.82	0.40	6.2		
	d		20 minutes at 45°		77.51	3.58	—	27.7	0.39	0.11	0.23	0.09	0.04	0.04	1.12	2.02	1.91	1.52	1.16	0.74	6.2		
	e	Malt	+ up to 70°	350.4	258.21	4.31	-	34.9	0.29	0.08	0.28	0.12	0.13	0.04	1.30	2.24	2.16	1.87	1.34	0.80	6.1	5.89	1.68
	f		+ 1 hour at 70°		267.92	4.38	—	34.9	0.37		0.28	0.14	0.15	0.05	1.33	2.32	—	1.95	1.38	0.79	6.1		
	g		+ boiling		268.93	4.37	—	34.9	0.26	0.09	0.28	0.16	0.13	0.05	1.33	2.30	2.21	1.95	1.38	—	6.1		
IV	b	Steep	20 hours at 20°	358.9	—	4.00	3.42	28.5	0.19	0.15	0.04	0	0.08	0.38		0.84	0.69	0.50	0.38	—	—	6.26	1.74
α	c	Malt			—	4.20	2.46	34.9	0.53	0.03	0.19	0.06	0.17	1.31		2.29	2.26	1.73	1.31	—	—	5.41	1.73
	g		Normal Method	312.6	248.9	3.72	2.94	34.5	0.31	0	0.30	0.12	0.24	1.51		2.48	2.48	2.17	1.51	—	—		
	Steep		0	358.9	—	4.00	3.42	28.5	0.19	0.15	0.04	0	0.08	0.38		0.84	0.69	0.50	0.38	—	—	6.26	1.74
β	Malt (germinated in days)		4	352.6	256.4	4.12	3.41	28.1	0.35	0.02	0.20	0.09	0.10	1.12		1.88	1.86	1.51	1.12	—	—	6.09	1.73
			7	331.6	259.7	—	—	32.3	0.35	0	0.27	0.14	0.20	1.46		2.42	2.42	2.07	1.46	—	—	5.73	1.73
			10	312.6	248.9	3.72	2.94	34.5	0.31	0	0.30	0.12	0.24	1.51		2.48	2.48	2.17	1.51	—	—	5.41	1.73
	Analytical errors			2.1	2.6	0.14	0.34	3.3				0.07						0.07			0.1	0.13	

Curve Table I.



——————— = N = Proteïd dissolution process.
— — — — — — — — = N ÷ A_{II} = Albumin conversion process.
. . . . . = P + T = Peptic action.
— · — · — · — · — = T = Tryptic action.
+ + + + + + = O = Peptid splitting.

Table XXII contains not only figures representing the quantity of each particular product of proteïd transformation or decomposition, but also figures which show the numerical value of each proteïd transformation or decomposition process when it takes place according to the scheme given on p. 279. As it may doubtless be taken for granted that the said processes are governed by the law of mass action, it follows that the particular processes must necessarily show oscillating numerical values that decrease somewhat (though not much) in proportion to one another, according as the decomposition or demolition of the proteïd molecule progresses. But the consequence must then be that in the course of each decomposition or experimental period the oscillations of each intermediate decomposition groups cannot be very considerable. This conclusion is borne out by the figures arrived

at, and I therefore take it that these considerations give further corroboration to the decomposition scheme on p. 279. All the irregularities exhibited by the figures will, on closer inspection, prove to be attributable to inevitable experimental errors and to be almost throughout equal to or even less than the analytical errors.

The questions which have to be cleared up first and foremost by means of the figures brought together in Table XXII may be summed up as follows: —

(I) Do the greatest transformations or decompositions occur during germination or mashing?

(II) At what time are the principal effects brought about during germination (malting)?

(III) In which stage of mashing do we meet with the greatest effects in the different directions?

(IV) Can a proteïd conversion that has been only partially accomplished during germination be completed in the course of mashing?

An inspection of Experiments I, II, III and IV (Table XXII and Curve Table I) will show that the actions or processes which are decisive for the values Extract Yield A, quantity of Soluble Mineral Constituents B and Acidity C, are represented only by comparatively small or even immeasurable values during germination, whereas they assert themselves particularly in the mashing process. We further find that the proteïd dissolution process N and albumin conversion process ($N \div A_{II}$) occur especially in germinating barley, and that the peptic action ($P + T$) and tryptic action T make themselves almost equally felt in germination and mashing, although generally a little more intensely in the former than in the latter. Finally, as regards peptid decomposition or splitting O, this is found to set in during germination and during mashing at low temperatures (up to 45°). As the acidity and the proportion of soluble mineral constituents indubitably stand in the relation of cause and effect[1]), we may from the just-mentioned facts draw the conclusion that the transformations of carbohydrates and of mineral matters take

[1]) The change occurring in these two values is probably due to one and the same cause, namely the conversion of organic phosphides and tertiary phosphates into secondary and primary phosphates.

TABLE XXIII.

Column marks				N	N÷AH	P+T	T	G	O
Experiment N	Transformation during			Numerical value of the processes, relating to 10,000 corns					
				Proteïd dissolution	Albumin conversion	Peptic action	Tryptic action	Ammonia separation	Peptid splitting
I	b ÷ a		steeping	0.19	0.18	0.19	0.12	÷0.01	0.02
	c ÷ b		germination	0.96	0.89	0.67	0.54	0.04	0.36
	d ÷ c	mashing	from 1° to 45°	0.12	0.06	0.15	0.12	0	0.13
	e ÷ d		from 45° to 70°	0.15	0.14	0.33	0.17	0	0.04
	f ÷ e		1 hour at 70°	0.09	0.09	0.11	0.07	0	0.02
	g ÷ f		boiling	÷0.02	0	0	0.02	0	÷0.02
II	b ÷ a		steeping	÷0.06	0.02	0.10	0.08	÷0.01	0.01
	c ÷ b		germination	0.85	0.74	0.53	0.45	0.02	0.30
	d ÷ c	mashing	from 1° to 45°	0.25	0.18	0.16	0.08	0	0.07
	e ÷ d		from 45° to 70°	0.13	0.10	0.29	0.24	0	0.02
	g ÷ e		1 hour at 70° + boiling	0.02	0.07	0.13	0.04	0	0
III	d ÷ c	mashing	from 1° to 45°	0.43	0.46	0.48	0.34	0.01	0.34
	e ÷ d		from 45° to 70°	0.22	0.25	0.35	0.18	0	0.06
	f ÷ e		1 hour at 70°	0.08	—	0.08	0.04	0.01	÷0.01
	g ÷ f		boiling	÷0.02	0.05	0	0	0	—
IV α	c ÷ b		germination	1.45	1.57	1.23	0.93	—	—
	g ÷ c		mashing	0.19	0.22	0.44	0.20	—	—
IV β	Germinated in		0—4 days	1.04	1.17	1.01	0.74	—	—
			4—7 days	0.54	0.56	0.56	0.34	—	—
			7—10 days	0.06	0.06	0.10	0.05	—	—
Analytical errors				0.07					

All figures without signs are positive.

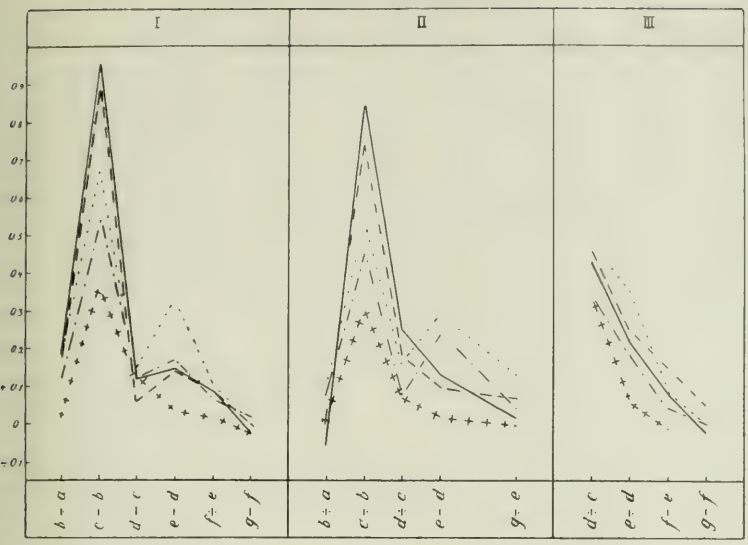
place especially in the course of the mashing process[1]), whilst the divers proteïd conversions come to pass chiefly during germination.

From Experiment IV β it appears that the proteïd conversation in germination is very nearly proportional to the time (duration of germination in days) up to the 7th day inclusive, at any rate so far as the principal processes are concerned.

In order to give a clearer idea of the progress of the proteïd conversions during germination and mashing, I have calculated the numerical value of each conversion process for each develop-

[1]) The maximum of these transformations is comprised between 45° and 70°; see later on.

Curve Table 2.



= N = Proteïd dissolution process.

= N ÷ A_{II} = Albumin conversion process.

= P + T = Peptic action.

= T = Tryptic action.

+ + + + + + = O = Peptid splitting.

mental or experimental stage (*i. e.*, during steeping, germinating from 0 to 4, 4 to 7 and 7 to 10 days, and mashing from 1° to 45°, from 45° to 70°, and so on). The figures are brought together in Table XXIII, and part of them graphically represented in Curve Table 2. The general impression conveyed by them is so instructive that many words are not required to show the relations between germinating and mashing in regard to proteïd conversion. If we consider its different stages, it will soon become clear that it will generally be sufficient to follow the four principal conversions: — the proteïd or albumin dissolution process N, the albumin conversion process (N ÷ A_{II}), the peptic action (P + T) and the tryptic action T. And precisely in respect of the relations between these four processes there is no reason to suppose the consecutive order mentioned above to be wrong.

It deserves notice that the separation of ammonia G, which is doubtless the last link of the chain of proteïd decomposition, only occurs in germination, but not in the course of

mashing[1]. This fact lends some countenance to the notion that the most far-going decomposition of the proteïd molecule takes place in germination, that is, during that part of the action in which the vital powers come into play. Since, however, the value G is always very small, there is also the possibility that certain rather loosely bound amino groups are readily separated from the proteïd molecule in the form of ammonia.

The above results and considerations enable us to answer the first three of the before-mentioned questions (p. 283): —

Re (I). Both the greatest quantitative and perhaps also the most thorough-going decomposition of the proteïd molecule takes place in the process of germination, where the vital forces are acting, whereas the most important effects in regard to the decomposition and transformation of carbohydrates and mineral constituents[2] occur during mashing, without the direct agency of the vital powers.

Re (II). The proteïd conversion during germination increases very nearly in proportion to the duration of the latter[3], up to the moment when the normal conversion is finished.

Re (III). The greatest effect in point of the conversion of carbohydrates and mineral matters during mashing occurs between 45° and 70°, the optimum being manifestly a few degrees below the maximum limit. It is to be remarked, however, that both the peptic and the tryptic action may also increase noticeably in the course of the mashing process (the optimum lying between 45° and 70°); this is the case when proteïd transformation has not been completed before the close of germination (short malt). When the germination process has been carried to an end (long malt), the action of proteolytic enzymes will not be furthered to any considerable extent by the mashing process[4].

[1]) Zeitschr. f. anal. Ch. **34**, 141 (1895).

[2]) See Note p. 283.

[3]) The process which requires the longest time is doubtless that of albumin conversion.

[4]) From the plain reason that the material acted upon by the enzymes has been almost exhausted.

In order to obtain an answer to the last question p. 283, we are obliged to again look at Table XXII and Curve Table 1. The figures in the column A_{II} show the amounts of nitrogen, in gr., in the form of albumin II (in 10,000 grains) at the successive stages. In the Experiments I and II the amount is found to increase in the course of germination and to increase still further, and not a little, in the first stage of mashing, whereas in the last stage of mashing a downward tendency is noticed. In Experiment III a somewhat similar result is seen, but rather vaguely. Experiment IV *a*, on the contrary, shows an altered state of affairs, the proportion of albumin II decreasing markedly in germination and, just as in Experiment III, undergoing a further decrease in the mashing process. On closer inspection we find that the value by which the amount of albumin II diminishes during mashing is fairly constant in all four experiments, namely 0.01 in Experiment I, 0.02 in II and III, 0.03 in IV *a*. This seems to warrant the conclusion that the amount of albumin II decreases to very nearly the same extent during mashing, whether proteïd conversion has been completed in germination or not. At the same time, however, the diminution of albumin II due to the mashing process itself is seen to be always very inconsiderable, and, consequently, we shall never be justified in hoping that a noticeable fault in proteïd conversion, due to an imperfect germination, will be rectified or adjusted in mashing. This state of affairs is very conspicuous on Curve Table 1, where the distance between the curves N and $N \div A_{II}$ is seen to correspond with the above value of albumin II.

We thus arrive at the following answer: —

Re (IV). If proteïd conversion during germination has been more or less imperfect, not coming to a close, the fault cannot be rectified or removed in mashing[1]).

Independently of the just mentioned results, our experiments also go to prove that proteïd transformation in germination (malting) does not go off with equal facility in all sorts of barley[2]).

[1]) This result appears to coïncide with those obtained by P. Petit. Chem. Centralb. 1910, I, 695. The original paper — Bull. de l'Assoc. des Chim. de Sucr. et Dist. **27**, 485 — has not been at my disposal.

[2]) Compt. rend. des travaux du Laborat. de Carlsb. **8**, 361 (1910).

Indeed it is seen that the speed with which proteïd transformation can be completed in germination does not depend, at all events not exclusively, on the total amount of nitrogen contained in the particular sort of barley. The samples of this cereal with which the Experiments I, III and IV were made contained from 1.7 to 1.8 % of total nitrogen in dry matter, whilst in the sample used in Experiment II the amount was only 1.5 %. In Experiment IV the proteïd conversion is found to be completed after 7 days' germination, and in Experiment III it is nearly completed after 8 days' germination, whilst in Experiment I it is rather imperfect after 8 days, and in Experiment II after 9 days. Thus, a comparison of Experiment II with Experiments I, III and IV shows, that the speed or facility with which proteïd transformation in germinating barley is accomplished is by no means in an inverse ratio to the nitrogen amount of dry matter, as it must be if Haase's valuation by the percentage of nitrogen was generally valid[1]). Furthermore, if we compare Experiment I with Experiments III and IV, we find that barleys having the same amount of total nitrogen cannot be ready-malted with equal facility, at any rate not as far as proteïd conversion is concerned. We are here probably in presence of a peculiarity of variety, which is of great importance for the valuation of malting barley. If the malting process is to be accomplished in a comparatively short time, one is obliged to select varieties or sorts of barley in which the proteïd conversion can be easily and quickly completed during germination, and so forth.

In judging the fitness of a barley for malting purposes it is therefore necessary to take into account not only its vitality or its behaviour in the steeping process[2]), but also the length of time it requires to bring the proteïd conversion to an end during germination. The last-mentioned factor can only be determined on the basis of an experimental malting in the laboratory or in a malt-house, unless it can be proved by future experiments to be a pronounced and constant specific or variety character. In order to get this question cleared

[1] A valuation by the nitrogen percentage will in all likelihood be applicable only to barleys of the same variety.

[2]) Compt. rend. des travaux du Laborat. de Carlsb. **8**, 357 (1910).

up it will be necessary to undertake malting experiments with several generations of real pure seed cultures of different sorts, species or varieties of barley, and not, as has been the case heretofore, with common commercial barleys, which always consist of several species or varieties.

A common operation in this direction has been planned by Professor Hjalmar Nilsson, Dr. H. Tedin (Sveriges Utsädesforening at Svalöf) and the author of this memoir, and the investigations will be commenced with barley harvested in 1912.

With regard to Experiment II it only remains to be mentioned that the last series of figures represent the quantity of substance groups found in the rootlets of 10,000 corns of barley. This series accordingly admits of being linked together or compared with the other numerical series relating to the same experiment. The figures show the combinations or forms in which nitrogen is withdrawn from the malted barley grain through the rootlets. These contain approximately 47 % of this nitrogen in the form of insoluble nitrogenous matter (proteïds), whilst about 53 % is present in the form of soluble nitrogenous matter, chiefly tryptic decomposition products (ammonia, amine-amid) *etc.* It is further to be mentioned that the results arrived at also prove that no free nitrogen is lost during germination, since it has been found that the amount of total nitrogen contained in 10,000 steeped grains (in the foregoing experiment) is 5.95 gr., in 10,000 malt grains 5.09 gr., and in the rootlets of the same number of grains 0.85 gr. (5.09 + 0.85 = 5.94).

Finally it deserves notice that the experiments do not show any change in the concentration of hydrogen ions in the course of steeping, germination and mashing, the exponent of that concentration having been found to be constant (setting aside experimental error) in the corn before and after steeping, as well as in the malt and wort. It is to be remarked, however, that the various mashings were made with distilled water. As we shall see later on, the concentration of hydrogen ions is more or less affected by the mashing if the distilled water is replaced by divers salt solutions, and it is also influenced by the boiling of wort with or without hops. The only conclusion that can be drawn from the fact referred to is therefore, that the concentration of hydrogen ions is unaffected by the steeping, germination and mashing processes in themselves. But

if the mashing water contains dissolved salts, these are liable to influence the concentration of hydrogen ions during the mashing process, whether this be done directly or by acting upon the salts contained in the malt. This very peculiar fact, of which we shall speak hereafter in greater detail, may without doubt be accounted for by the buffer theory set forth by A. Fernbach and L. Hubert[1]), and by S. P. L. Sørensen[2]). It is a matter of course that under the conditions in question the buffer must be of a very complex nature, because barley contains mixtures of salts having the kations $PO_4^{'''}$, $SiO_3^{''}$, $SO_4^{''}$ and Cl', and the anions $Ca^{''}$, $Mg^{''}$, $Na^{'}$ and $K^{'}$, besides several proteïd substances and organic acids. E. Wolff's analyses of barley ash[3]), in conjunction with the observations made by W. Windisch and W. Vogelsang[4]) and by S. Posternak[5]), lead us to the conclusion that, if the whole amount of phosphorus in barley is in the form of an acid lime-magnesium salt of the tetrabasic anhydrooxymethylendiphosphoric acid: —

$$O < \begin{matrix} CH_2 \cdot O \cdot PO(OH)_2 \\ CH_2 \cdot O \cdot PO(OH)_2 \end{matrix} = \text{Phytine},$$

then the whole quantity of potassium must be bound to the silicic acid in the form of an acid silicate, and the whole amount of sodium must be fixed to the total amount of sulphuric acid and hydrochloric acid in the form of normal sodium sulphate and chloride. The buffer in barley must therefore be supposed to consist of an acid lime-magnesium salt of anhydrooxymethylendiphosphoric acid, an acid potassium silicate and divers proteïd substances, perhaps in the form of albuminates. In the course of the malting and mashing processes the anhydrooxymethylendiphosphoric acid is converted into the common tribasic phosphoric acid, the amount of organic acids being augmented at the same time. In consequence, the acidity also increases; but, since the concentration of hydrogen ions does not increase at the same time, it is to be supposed that the higher acidity, by acting upon the acid potassium silicate, throws down silicic acid, a process which may safely be imagined to balance the concen-

[1]) Compt. rend. de l'Acad. des sciences **131**, 293 (1900).
[2]) Compt. rend. des travaux du Laborat. de Carlsb. **8**, 120 (1909).
[3]) Aschen-Analysen, II. Theil. Berlin 1880. pp. 11 and 142.
[4]) Wochenschr. f. Brauer. **23**, 516 (1906).
[5]) Compt. rend. de l'Acad. des sciences **137**, 202, 337, 439 (1903).

tration of hydrogen ions without noticeably affecting the acidity. Moreover, as shown by S. P. L. Sørensen[1]), the albuminates are also able to act as buffers.

But, of course, what I have said here is only a faint attempt at accounting for the experimental facts in question.

C. The Relation of Peptid Splitting to the previously mentioned Proteïd Conversion Processes.

S. P. L. Sørensen says in the first part of his Enzyme Studies[2]): — "The natural proteïd substances and their first demolition products, on the contrary, probably consist, besides the nucleus containing amino-acid, of smaller quantities of other groups, about whose connection with the amino-acids, as also about their relations to the proteolytic enzymes, very little is known as yet. . Apart from this circumstance, a proteolytic decomposition is accordingly to be looked upon as a hydrolysis with formation of carboxyl and amino groups, —". This is certainly quite correct if we are allowed to look at the question apart from the connections about which we do not yet know anything. There are, however, certain established facts which oblige us to take those unknown forms of linking into account, since H. Skraup[3]), Th. B. Osborne, S. Leavenworth and A. Brautlecht[4]), and T. B. Johnson[5]) have proved that the proteïd molecule exhibits or at any rate may exhibit, besides the peptid linking, other forms of knitting together between its various components.

The term proteolysis may theoretically be differently defined. It is an obvious conclusion that this process may be regarded as a cleavage of peptid bindings, providing that all proteolytic transformations constantly give a measurable result with regard to the splitting up of peptid links, but only on this condition!

It is evident that the precipitation methods — whether consisting in a series of precipitations with different salts or in salting out repeatedly with one particular salt — can never give any

---

[1]) Compt. rend. des travaux du Laborat. de Carlsb. **10**, 1 (1911).
[2]) Ibid. **7**, 3 (1907).
[3]) Österr. Chem. Zeit. [2], **11**, 91 (1908).
[4]) Amer. Journ. Physiol. **23**, 180 (1908—1909).
[5]) Journ. Biol. Chem. **9**, 439, 449 (1911).

information about that part of proteolytic decomposition which consists in a demolition af more complex amine-amid compounds into less complex ones. The precipitation methods, of their very nature, can only furnish a measure of that part of proteolytic decomposition which is brought to a close with the formation of the most complex amine-amid compounds (polypeptids[1]); but in regard to this part of proteolysis they are certainly able to furnish the necessary holds if properly carried out.

On the other hand, if what is wanted is simply to determine one single precipitation limit (say by means of tannic acid or uranium acetate), we can of course arrive only at drawing the decomposition line for one single aspect of proteolysis, — in the present case, for the tryptic action.

In what follows I will endeavour to show that, just as the precipitation methods are unable to mark that part of proteolysis which consists in more complex amine-amid combinations being decomposed or broken down into less complex ones, so the peptid splitting cannot always be considered as a sure measure of the particular part of proteolysis which is generally termed the peptic action.

A comparative inspection of those figures in Table XXIII which give the numerical values of the different transformation processes (see also Curve Table 2) will show that the value relating to the peptid splitting process (O) does not bear any constant proportional relation to one single of the proteïd conversion processes (N, $N \div A_{II}$, P + T, T), and least of all to the process (P + T), the peptic action. This will become still more conspicuous if from Table XXIII we calculate the relation between each proteïd conversion process and the peptid splitting, as has been done by S. P. L. Sørensen[2]). Those experiments in which the peptid splitting is negative have been left out. The ratios arrived at are found in Table XXIV.

It is a common feature in all four series of ratios that they continually change, now in one and now in another direction. It will be observed that, as a rule, the ratios decrease gradually in the course of germination and during mashing up to the temperature 45°; whilst in mashing they increase from 45° up

---

[1]) S. P. L. Sørensen, *loc. cit.*, p. 2.

[2]) *loc. cit.*, p. 52, Table 28.

TABLE XXIV.

Experiment No.	During			Ratio $\frac{N}{O}$	Ratio $\frac{N \div A_{II}}{O}$	Ratio $\frac{P + T}{O}$	Ratio $\frac{T}{O}$
I	b ÷ a		steeping	9.5	9.0	9.5	6.0
	c ÷ b		germination	2.7	2.4	1.9	1.5
	d ÷ c	mashing	from 1° to 45°	0.9	0.5	1.2	1.0
	e ÷ d		" 45° " 70°	3.9	3.5	8.3	4.3
	f ÷ e		+ 1 hour at 70°	4.5	4.5	5.5	3.5
II	b ÷ a		steeping	—	2.0	10.0	8.0
	c ÷ b		germination	2.8	2.5	1.8	1.5
	d ÷ c	mashing	from 1° to 45°	3.6	2.6	2.3	1.1
	e ÷ d		" 45° " 70°	6.5	5.0	14.5	12.0
	g ÷ e		+ 1 hour at 70° + boiling	∞	∞	∞	∞
III	d ÷ c	mashing	from 1° to 45°	1.3	1.4	1.4	1.0
	e ÷ d		" 45° " 70°	3.7	4.2	5.8	3.0

to 70° and upwards. These results coïncide essentially with the change pointed out by Sørensen in the aforementioned Table. Thus, in close accord with Sørensen's statement in the paper quoted above (at page 53), we also find in these cases that the peptid splitting (O) is not identical with any of the here mentioned proteïd conversion processes; hence it follows that by measuring the peptid splitting alone we are not enabled to decide, either quantitatively or qualitatively, which kind of proteïd decomposition or transformation we have to do with.

I will try to make good this assertion. If we suppose a proteïd molecule to be subjected to a hydrolytic or proteolytic action, it cannot, as a fact, be broken down all at once to the simplest substances that enter into its composition; but the whole transformation or decomposition takes place step by step, so that a whole series of decomposition individuals (intermediate stages) are produced before we reach down to the simplest constituents. It is also an indisputable fact that some of these intermediate stages have still preserved their character as pro-

teïds, whilst others have lost it. Some of these intermediate bodies come into existence by one definite agency, others by another. If we can determine the quantity of decomposition products produced by each particular agency, we can also calculate the numerical values of the decomposition process concerned, no matter whether the analytical work be effected by means of a series of precipitations with different salts or a series of fractional out-saltings with one definite salt. Now if we remember that there does not exist any constant proportional ratio between the processes of proteïd decomposition or transformation in question, on the one hand, and, on the other, the peptid splitting, the inquiry immediately arises: — Can the measurement of the extent of peptid splitting replace those of the various proteïd conversion processes? The question may also be formulated as follows: — If in a definite proteïd hydrolysis say six peptid bindings have been split up, will it then be immaterial whether this has only given rise to new water-soluble albumins, or whether a formation of proteoses, peptones or perhaps even amine-amid has taken place? This question is without doubt to be answered in the negative.

The fact is that in order to get a thorough insight into the nature of a proteïd hydrolysis it is not enough to know the extent or degree of the peptid splitting; we must also know the character of the proteïd conversion, because the properties of the various decomposition individuals or groups of decomposition individuals differ widely both chemically and physiologically. The proteïd hydrolysis can, however, be followed only to a certain point by the aid of the various methods of proteïd precipitation, namely up to the formation of the most complex amine-amid compounds (polypeptids?). If these are broken down to less complex amine-amid compounds, the precipitation methods cannot of course give any conclusive result; but here the measurement of the peptid splitting comes in to our assistance, and will prove to be of great and decisive importance[1]).

These considerations therefore lead us to the principal conclusion, that the peptid splitting and the different pro-

[1]) Valuable information may also be obtained by means of the treatment with nitrous acid as employed by H. T. Brown (Sachsse-Kromann's method). Transact. Guinness Res. Laborat. Vol. I, Part I, p. 30 (1903).

teïd transformation processes do not bear any constant proportional relation to one another, but that the measurements of the extent of peptid splitting and different proteïd transformation processes act as supplements to one another, the latter processes exclusively marking the proteolysis or hydrolysis down to the most complex amine-amid compounds, whilst the peptid splitting particularly marks the decomposition of the most complex into the less complex amine-amid compounds. By combining the two methods we shall therefore be enabled to follow proteïd hydrolysis down to the very lowest stages of decomposition.

D. Influence of Mashing Factors on Proteïd Transformation.

The results arrived at above have clearly shown that the principal transformations of proteïd substances occur in the process of germination (malting) and not in mashing. If therefore we have now to direct our attention to the influence exerted by each particular mashing factor upon proteïd transformation, we cannot expect to meet with any very marked fluctuations in the experimental results, even if one definite factor changes noticeably in the course of the experiment. We should not, however, be justified in leaving out entirely these experiments; for it is quite possible that the comparatively inconsiderable fluctuation or modification in proteïd transformation which is the result of one definite factor being changed, may answer to the fractional part of the aggregate action or transformation which we lack and which we therefore wish to attain.

The enzymatic decomposition of carbohydrates as well as proteïd substances has been made the subject of a large amount of thorough-going research-work at the hands of many inquirers, who have established the optimum conditions of the various enzyme actions. The object of the present investigations is of a different character, namely to establish the change undergone by the relation between the various proteïd transformations when one definite mashing factor is modified.

We have seen above that some of these proteïd transformation processes, and more particularly the peptic action, may take place with greater intensity during mashing than others, and this

has been shown to occur especially in the case of a malt in which the transformation has not been brought to a close in the course of germination (short malt). This is the reason why the malt samples employed in my mashing experiments were only partially ready-germinated.

In my account of the importance of the various mashing factors for proteid transformation I will follow the same consecutive order that was used in my description of the principal experiments, namely: the degree of fineness of malt meal, concentration of mash, mashing temperature, duration of preparatory mashing, time of boiling of mash (before filtering off the wort), elutriation of husks, and salt effect.

(a) Degree of Fineness of Malt Meal.

(See II Series of Experiments, p. 243).

Table XXV shows that the transformations are but shightly influenced by the degree of fineness of the malt meal. It is only in the case of two processes that the results arrived at exhibit variations greater than the experimental error, namely the extract formation A and proteid dissolution process N; moreover, in the latter case the difference is very small. This is only what was to be expected, and earlier researches[1]) have given the same result.

TABLE XXV.

100 gr. of malt dry matter contains 1.60 gr. of total nitrogen and 2.38 gr. of total ash.

Column marks	A	B	C	A_I	A_{II}	D	E	F	G	H	N	$\frac{N}{A_{II}}$	$\frac{P}{T}$	T	G
Fineness of malt meal	% of extract of malt dry matter	100 gr. of dry matter contains		% of total nitrogen of malt is found in the form of							Numerical value of the processes, in proportion to total nitrogen				
		gr. of soluble ash	Acid ∞ cc. of norm. NaOH	Albumin		peptic cleavage products = P			tryptic cleavage prod. = T		Proteid dissolution	Albumin conversion	Peptic action	Tryptic action	Ammonia separation
				I	II	Demuclein	Proteose	Peptone	Ammonia	Amine-Amid					
Fine Meal	78.96	1.18	9.1	3.8	4.2	4.1	1.5	2.7	0.8	20.8	37.9	33.7	29.9	21.6	0.8
Coarse Meal	78.42	1.18	9.1	3.8	3.4	4.2	1.9	2.7	0.6	21.0	37.6	34.2	30.4	21.6	0.6
Groat	77.79	1.23	9.1	4.2	3.4	3.8	1.5	3.0	0.6	20.6	37.1	33.7	29.5	21.2	0.6
Analytical errors	0.2	0.06	0.4	0.7					0.4		0.4—0.7				

[1]) H. T. Brown, Journ. of Instit. of Brew. **15**. 218 (1909).

The yield of extract diminishes noticeably, and the amount of soluble nitrogenous matter very little, as the degree of fineness of malt meal becomes lower. The ratio of the amount of extract and that of soluble nitrogen, however, do not undergo any appreciable change, since 100 parts of extract contain 0.768, 0.767 and 0.763 parts, respectively, of soluble nitrogen, according as fine meal, coarse meal or groat is mashed.

(b) Concentration of Mash.

(See III Series of Experiments, p. 243).

In these experiments the change in the course and correlations of the processes is chiefly, if not exclusively, contingent upon the enzyme concentration.

TABLE XXVI.

100 gr. of malt dry matter contains 1.60 gr. of total nitrogen and 2.38 gr. of total ash.

Column marks	A	B	C	A_I	A_{II}	D	E	F	G	H	N	$N \div A_{II}$	P+T	T	G
Normal Mashing. 50 gr. of fine meal mashed with — cc. of distilled water	% of extract of malt dry matter	100 gr. of dry matter contains		% of total nitrogen of malt is found in the form of							Numerical value of the processes, in proportion to total nitrogen				
		gr. of soluble ash	Acid $\simeq$ cc. of norm. NaOH	Albumin		peptic cleavage products = P			tryptic cleavage prod. = T		Proteid dissolution	Albumin conversion	Peptic action	Tryptic action	Ammonia separation
				I	II	Denucleïn	Proteose	Peptone	Ammonia	Amine-Amid					
100	78.37	1.19	9.2	5.3	2.0	4.9	1.5	2.7	0.9	22.8	40.1	38.1	32.8	23.7	0.9
200	78.68	1.17	9.2	5.3	2.0	4.9	1.9	1.9	0.8	22.5	39.3	37.3	32.0	23.3	0.8
300	79.21	1.31	9.2	5.0	2.3	4.9	1.9	2.7	0.9	20.8	38.5	36.2	31.2	21.7	0.9
350	78.78	1.25	9.2	4.2	3.4	4.6	1.9	2.7	0.8	20.5	38.1	34.7	30.5	21.3	0.8
Analytical errors	0.2	0.06	0.4	0.7					0.4		0.4—0.7				

Table XXVI proves that the extract yield increases noticeably and very nearly in a direct ratio to the quantity of water used, until it reaches 6 parts of water to 1 part of malt meal. If 7 parts of water are used with 1 part of meal, the extract yield again decreases noticeably. Almost the same is the case with the mineral constituents, only with this difference that increase and decrease of the latter are so inconsiderable as to nearly coïncide with the analytical error and to enjoin a certain

reserve in judging. Conformably[1]) to this result we find the same acidity whether 1 part of malt meal be mashed with 2, 4, 6 or 7 parts of water.

The case is somewhat different when we inquire into the influence exerted by the concentration on proteïd transformation during mashing. In harmony with the results obtained by R. Wahl and A. Nilson[2]), the amount of soluble nitrogen, or the proteïd dissolution process N is found to decrease as the quantity of water increases; in the instance before us it is even in an exactly inverse ratio to the water amount. A similar result is arrived at in regard to all the proteïd transformation processes, excepting the liberation of ammonia, which shows no change at all; this agrees perfectly with what has been mentioned above. Whilst the proteïd dissolution process N decreases in an inverse ratio to the water amount, or in a direct ratio to the concentration of the mash, the albumin conversion process ($N \div A_{II}$), the peptic action ($P + T$) and the tryptic action T are seen to decrease a little more markedly in proportion to the water amount or mash concentration. Furthermore, it clearly appears from the figures that the albumin conversion process is, among all the proteïd transformation processes, the one that is influenced to the greatest extent by the mash concentration.

Thus, the concentration has turned out to exert a rather considerable influence upon the various transformations going on in the course of mashing. As, however, the maximum effect is not brought about at the same concentration in the case of carbohydrates as it is in the case of proteïd substances, we may by changing the mash concentration, from the same malt sample prepare different worts in which the ratio of total extract and total nitrogen is changed in one or the other direction. The instance under consideration shows the following change:

[1]) See Foot-note pag. 283.

[2]) Amer. Brew. Rev. **7**, 579 (1894). Ref. Zeitschr. f. d. ges. Brauw. **17**, 247 (1894).

1 part of malt meal mashed with — parts of water	100 parts of extract contain — parts of total nitrogen
2	0.819
4	0.799
6	0.777
7	0.774

We cannot, however, take it for granted that we may without any reservation consider this mashing factor as capable of regulating the relation between extractive matters and total nitrogen. It is to be observed here that the maximum for the formation of extract (transformation of carbohydrates) lies, approximately, at the concentration 1:6, and for proteïd conversion at 1:2 or there about, perhaps even at a considerably greater concentration. If, therefore, we want an extract with a comparatively low nitrogen content, we need simply reduce the mash concentration (say to 1:6); but at the same time we run the risk that the proteïd conversion processes, and more especially the albumin conversion process, are not completed, and that, consequently, we get an extract that, whilst having the lower nitrogen content desired, does not contain the various proteïd conversion products in the right proportion. If by the reduction of the mash concentration the albumin conversion process is weakened more than the proteïd dissolution process, this will be practically synonymous with an increase in the amount of albumin II. Accordingly, if the mash concentration is to be taken as regulating the relation between extract and total nitrogen, this proceeding — supposing both the qualitative and quantitative requirements are to be fulfilled — can be used only in those cases in which the albumin conversion process has already been brought to an end in the course of germination (malting).

The faculty of clarification of the wort and the time in which it runs off are also influenced in a certain measure by the mash concentration. Both of them decrease a little as the concentration decreases. In our case the time of running off reached its minimum, or, in other terms, the running off velocity reached its maximum, at the concentration 1:4, whereas the faculty of clarification continued falling off down to the concentration 1:7, and would

probably have persisted in so doing if the mash concentration had been further diminished.

(c) Mashing Temperature.

(See IV Series of Experiments, p. 243).

From the accompanying Table XXVII it appears that the optimum temperatures found by me for the transformation of carbohydrates and for the peptic and the tryptic action are very nearly identical with those established by previous inquirers[1]). Thus, the analytical method used in these researches discloses the same changes and decompositions as those previously found to take place. The reason why I desire to emphasise this fact is that in my opinion it goes to prove that the quantitative method proposed by me for the separation of the different groups of proteïd transformation and decomposition products is perfectly practicable and able to throw light upon the whole course of proteïd hydrolysis, both qualitatively and quantitatively, although of course only down to the aforementioned limit (formation of amine-amid combinations). The Table exhibits the following optimum temperatures for the various actions and transformations:

Transformation of carbohydrates.....	about	65 ^{0}
— - mineral constituents.	-	45 ^{0} to 55 ^{0}
Formation of acid.....	-	45 ^{0}
Proteïd dissolution process.....	-	45 ^{0}
Albumin conversion process.....	-	45 ^{0}
Peptic action.....	-	55 ^{0}
Tryptic action.....	-	45 ^{0}
Peptid splitting.....	-	38 ^{0} to 45 ^{0}
Peroxidase action.....	-	20 ^{0}
Catalase action.....	-	10 ^{0} to 45 ^{0}

In opposition to F. Weis[2]) I find no optimum zone of tryptic action, but an optimum point at least as sharply defined as in the case of the other proteïd transformation processes. In conformity to Weis I find the optimum temperature of the tryptic action to be situated a few degrees lower than that of

[1] R. Wahl and A. Nilson, *loc. cit.*, and F. Weis, Compt. rend. des travaux du Laborat. de Carlsb. **5**, 133 (1903). [2]) *loc. cit.*

TABLE XXVII.

100 gr. of malt dry matter contains 1.74 gr. of total nitrogen.

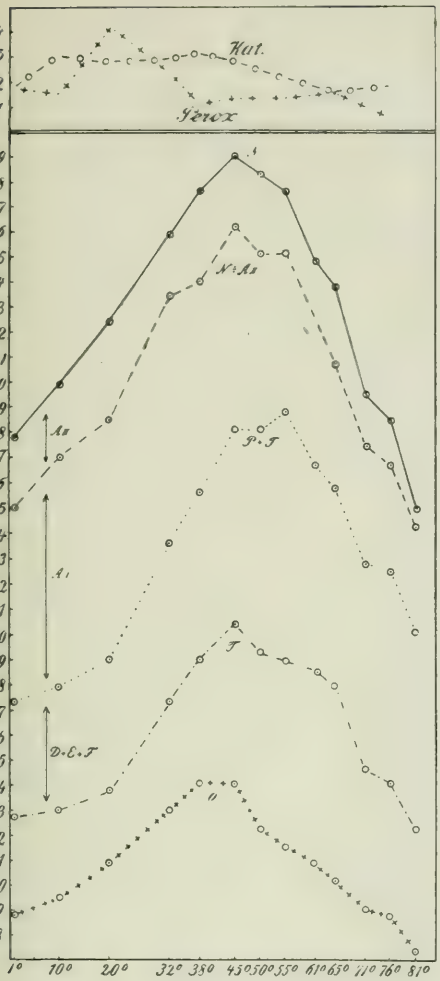
Column marks	A	B	C	A_I	A_{II}	D	E	F	G	H	N	$N \div A_{II}$	P+T	T	G	O	Perox.	Catal.	
50 gr. of fine meal mashed 1 hour with 200 cc. of distilled water at temperature	% of extract of malt dry matter	100 gr. of dry matter contains		% of total nitrogen of malt is found in the form of							Numerical value of the processes, in proportion to total nitrogen						1 gr. of dry matter gives off — cc. of oxygen measured at 0° and 760 mm.		PH measured in dilute wort
		gr. of soluble ash	Acid ≙ cc. of norm. NaOH	Albumin		peptic cleavage products — P			tryptic cleavage prod. = T		Proteid dissolution	Albumin conversion	Peptic action	Tryptic action	Ammonia separation	Peptid splitting			
				I	II	Denucleïn	Proteose	Peptone	Ammonia	Amine-Amid									
1°	19.41	0.71	7.0	7.7	2.8	1.8	1.1	1.7	0.5	12.2	27.8	25.0	17.3	12.7	0.5	8.8	1.7	1.8	6.1
10°	20.79	0.91	7.9	9.1	2.9	1.4	0.3	3.2	13.0		29.9	27.0	17.9	13.0	—	9.5	1.5	3.0	6.1
20°	23.12	—	9.2	9.5	3.9	1.7	0	3.5	0.7	13.1	32.4	28.5	19.0	13.8	0.7	10.9	4.1	2.8	6.1
32°	25.92	1.35	10.1	9.8	2.5	2.8	0.4	3.1	17.3		35.9	33.4	23.6	17.3	—	13.0	2.3	2.9	6.1
38°	27.61	—	10.9	8.4	3.6	2.8	0.3	3.5	0.7	18.3	37.6	34.0	25.6	19.0	0.7	14.1	1.1	3.1	6.1
45°	33.47	1.43	11.8	8.1	2.8	3.5	0.7	3.5	20.4		39.0	36.2	28.1	20.4	—	14.1	1.3	2.8	6.1
50°	51.03	1.43	11.4	7.0	3.2	3.5	1.4	3.9	0.7	18.6	38.3	35.1	28.1	19.3	0.7	12.3	—	—	6.1
55°	64.07	1.44	10.9	6.3	2.5	4.2	2.5	3.1	19.0		37.6	35.1	28.8	19.0		11.6	1.3	2.1	6.1
61°	78.09	1.35	10.5	8.1		2.8	1.4	3.9	0.5	18.1	34.8	—	26.7	18.6	0.5	10.9	—	—	6.1
65°	78.30	1.36	10.1	4.9	3.1	2.9	1.1	3.8	18.0		33.8	30.7	25.8	18.0	—	10.2	1.5	1.6	6.1
71°	76.94	1.14	7.9	4.7	2.0	3.9	1.4	2.8	0.5	14.2	29.5	27.5	22.8	14.7	0.5	9.1	—	—	6.1
76°	76.62	—	7.4	4.2	1.8	3.5	2.1	2.8	14.1		28.5	26.7	22.5	14.1	—	8.8	0.5	1.8	6.1
81°	75.89	1.11	6.6	4.2	0.7	3.5	1.8	2.5	0.5	11.8	25.0	24.3	20.1	12.3	0.5	7.4	—	—	6.1
Analytical errors	0.2	0.06	0.4	0.7					0.4		0.4–0.7								0.1

the peptic action. The differences between the figures obtained by Weis and those given here are very small, and appear to be attributable to differences of acidity and hydrogen ion concentration. It seems to me less probable that the discrepancies could be due to different proteïd individuals having been exposed to enzymatic action.

These experiments, like all earlier researches, show that the quantitative aspect of proteïd transformation is to a very great extent influenced by the mashing temperature, and, seeing that the increase and decrease of peptid splitting have proved to be as dependent on the mashing temperature as all the other proteïd transformation processes, the quantitative aspect of proteïd transformation may perhaps be followed by means of formol titration (measurement of the peptid splitting) as well as by determining the numerical value of any one of the proteïd transformation processes in question. The titration by formol, however, will always be found to give a noticeably lower figure than the other determinations, whilst requiring a somewhat less amount of analytical work, although certainly not much less than that demanded by the determination of the total nitrogen content of the experimental liquid. On the contrary, if we have to trench upon the qualitative progress of proteolysis, the matter is quite different. If the qualitative side of proteolysis is modified or influenced say by a change of the temperature at which the reaction takes place, it is evident that such a modification cannot be disclosed by means of a single measurement or precipitation; but these must be undertaken in sufficient number to call forth the different parts of the qualitative change.

If in Table XXVII we examine the columns A_I, A_{II}, D, E, F, H and N, it cannot escape our notice that the mash temperature exerts a marked influence upon the qualitative progress of proteolysis, since the proportions of the various groups of transformation or decomposition products are seen to undergo continual modifications. The easiest survey can be obtained by viewing the Curve Table 3, where the abscisses represent the temperature, and the ordinates the values arrived at for the different processes. The curves are marked out with their respective column marks see Table XXVII). The distance between the four curves representing the proteïd transformation processes shows the way in which the quantities of the proteïd groups

Curve Table 3.



— — — — = N = Proteid dissolution process.
— — — — = N + A_{II} = Albumin conversion process.
. . . . . = P + T = Peptic action.
— . — . — = T = Tryptic action.
+ + + + = O = Peptid splitting.
+ + . + + . + = Peroxidases.
— o — o — o — o = Catalases.

A_{II}, A_I and (D + E + F) vary in the course of the experiment. This state of affairs is also marked out on the Curve Table by means of vertical double arrows.

It will immediately be observed that the curves do not exhibit any marked breach of continuity until the maximum of the process concerned is reached. The irregularities met with in this part of the curves do not exceed the analytical error. But as soon as we go beyond the optimum temperature, considerable fluctuations are seen to occur in all four transformation curves and even in that of peptid splitting), so that we cannot possibly

attribute them to analytical error, but are compelled to seek another cause. It will obviously be found in the manner in which the present albuminoid matters coagulate. Th. B. Osborne[1]) has shown that leucosin of barley coagulates at a temperature of 52°, leucosin of malt at 58°, edestin only above 90°, and bynedestin at 85°. Hence, as soon as the mash temperature surpasses 52°, the albumins begin to coagulate out, and will do so to a larger extent as the temperature rises. Owing to the character of the experiments it has not been possible to judge of the extent of the coagulation, because the coagulate is throughout comprised in the value "insoluble proteïd individuals" and, accordingly, constantly influences the value "soluble proteïd individuals" N by a corresponding quantity with the opposite sign. The fluctuations in the N curve begin to manifest themselves as soon as the temperature 61° is reached, perhaps even a little before, and they are then of course transmitted from the N curve to the other curves.

Whether the above remarks be taken into consideration or not, there can be no manner of doubt but that the qualitative progress of proteolysis is noticeably influenced by the mashing temperature, seeing that the curves of Table 3 are not parallel to each other and the proportions of the various decomposition products are also fluctuating (see Table XXVII). As an example showing that the choice of the right mash temperature will enable us to ensure beforehand that the proteïd transformation is broken off in a definite point, it may be mentioned that if we wish to prepare from a given malt a wort that contains the greatest possible amount of peptic decomposition products (denuclein, proteose, peptone), the mashing must be commenced at the optimum temperature of peptase (about 55°), which is a few degrees higher than that of tryptase. It is evident that the tryptic action will then be somewhat weakened in proportion to the peptic action, and, consequently, the wort will contain a maximum of peptic decomposition products.

It thus appears once more that as soon as there is a question of establishing and following qualitative changes in proteolysis, it will always be necessary to procure so many known decomposition lines that those changes become observable. It will

[1]) Report. Conn. Agricult. Experim. Stat. **1894**, p. 165; **1895**, p. 239.

never suffice to follow one single transformation or decomposition process.

The fact that the liberation of ammonia is not influenced by the mashing temperature tallies perfectly with what has been mentioned before. It is also seen that the mashing temperature does not by itself influence the concentration of hydrogen ions.

Finally, it appears from our experiments that the action of peroxidase increases from 10° to 20°, but also that the enzyme is very soon destroyed when the temperature exceeds 20°. At 38° the action of the peroxidase appears to have almost ceased. This result seems to infirm the belief of A. Bach[1]) that peroxidases might have some influence upon the growth of yeast or upon its physiological and chemical function. In the finished brewery wort the peroxidases have probably ceased to exist as enzymes.

The catalases of malt, on the contrary, exercise their maximum action at as low a temperature as 10°, and only begin to be weakened at temperatures above 45°.

If we bear in mind that the two enzymes here mentioned occur in such small quantity in malt, and, moreover, that they are impaired or even destroyed at such low temperatures as those referred to, it seems to me quite preposterous to suppose that they could be capable of exerting any material influence on the brewing processes comprised under mashing and fermentation. On the other hand, it appears to be quite probable that they are of some importance to the vitality conditions of barley.

(d) Duration of Initial Mashing.

(See V Series of Experiments, p. 244).

By the Duration of Initial Mashing I mean the length of time during which the mixture of malt meal and water is kept at the initial mashing temperature. It admits of no doubt that this factor plays a certain part — more or less important according to the quality of the malt — in regard to the progress of proteolysis during the principal mashing. As for the qualitative and — to a less degree — the quantitative value of this

[1]) Ber. d. deutsch. chem. Ges. **39**, 1664 (1906).

action, the views expressed by different searchers diverge considerably[1].

The experiment which we have to deal with here is a typical one if the initial mashing is made at 45° with a nearly ready-germinated malt. The case will of course be somewhat different if the initial mashing is carried out with a different malt or at another temperature. With regard to the latter I may refer to the chapter dealing with the mashing temperature, where the optimum temperatures of the various proteïd transformation processes are mentioned. The reason why I have chosen 45° as the initial mashing temperature, is simply the fact that this temperature represents the optimum of most of the said processes, or at any rate does not exceed the optimum of one single of them. Accordingly this temperature may be expected to show the most marked result of the influence of proteolysis, excepting the case of peptic action, the optimum of which lies in the vicinity of 55°.

The results brought together in Table XXVIII can be easily surveyed, so that they need not be put together graphically.

TABLE XXVIII.

100 gr. of malt dry matter contains 1.60 gr. of total nitrogen and 2.38 gr. of total ash.

Column marks	A	B	C	A_I	A_{II}	D	E	F	G	H	N	$N \div A_{II}$	P+T	T
Normal Mashing after initial mashing with 200 cc. of distilled water at 45° for — minutes	% of extract of malt dry matter	100 gr. of dry matter contains		% of total nitrogen of malt is found in the form of							Numerical value of the processes, in proportion to total nitrogen			
		gr. of soluble ash	Acid ∞ cc. of norm. NaOH	Albumin		peptic cleavage products = P			tryptic cleavage prod. = T		Proteïd dissolution	Albumin conversion	Peptic action	Tryptic action
				I	II	Demuclein	Proteose	Peptone	Ammonia	Amine-Amid				
0	78.33	1.20	9.1	6.8	1.2	3.8	1.5	2.3	0.4	20.9	36.9	35.7	28.9	21.3
20	78.96	1.25	10.0	7.2	0.8	4.2	1.5	2.3	0.6	21.8	38.4	37.6	30.4	22.4
30	78.96	1.29	10.0	7.2	0.7	4.6	1.6	1.9	0.6	22.2	38.8	38.1	30.9	22.8
60	79.17	1.28	10.4	8.0	0.3	4.2	1.2	2.3	0.6	22.5	39.1	38.8	30.8	23.1
Analytical errors	0.2	0.06	0.4	0.7					0.4		0.4—0.7			

The conversion of carbohydrates (column A) is seen to increase a little when the time of initial mashing is prolonged.

[1]) I. van Hest, Zeitschr. f. d. ges. Brauw. **31**, 563, 645 (1908); **32**, 30 (1909). C. Bleisch, *ibid.* **31**, 633 (1908); **32**, 43 (1909). W. Windisch, Wochenschr. f. Brauer. **26**, 18 (1909). E. Moufang, *ibid.* **26**, 43 (1909). R. Wahl and A. Nilson, *loc. cit.*

It does not, however, increase in proportion to this factor; for the maximum is nearly reached at the end of 20 minutes, the yield of extract being increased by 0.63 %; 40 minutes later the increase only amounts to 0.21 %. The same state of affairs is met with in the columns relating to soluble mineral constituents (B) and to acid (C), only with this difference that in the latter column the maximum is not reached at all. In the course of the first 30 minutes initial mashing at 45° the figure representing mineral constituents has been increased by 0.09 gr., and the acidity by 0.9 cc., whereas during the next half-hour the increase is only 0 gr. and 0.4 cc., respectively.

If we take into consideration the analytical error, we arrive at very simple results with regard to the influence exerted by the time of initial mashing on the total proteïd transformation during the principal mashing, it being found that all the proteïd transformation processes nearly attain their maximum after 30 minutes' mashing at 45°. The influence exerted by another half-hour's initial mashing is so trifling as not to exceed the analytical error. It is only in the albumin conversion process ($N \div A_{II}$) that an increase may perhaps be said to occur during the last half-hour's initial mashing.

Just with regard to the albumin conversion process this result seems to furnish a hint of some interest. On comparing the numerical series N and ($N \div A_{II}$), we find the numerical values of the proteïd dissolution and albumin conversion processes to approach to each other more and more as the time of initial mashing is prolonged, the latter process being advanced more than the former. From this it might be inferred that, if initial mashing be continued for a sufficient time at the optimum temperature of the albumin conversion process, it may be possible, from a malt in which the transformation of proteïds (and more especially albumin) has not been brought to an end during germination, to prepare a wort in which the conversion of albumin has been completed, so that the wort does not contain albumin II. The experiment under consideration shows, however, that we must not be too sanguine as to the possibility of doing away the injurious consequences of an incomplete germination by means of a proper initial mashing. The albumin conversion during germination has not been completed in the malt experimented upon, since it still contains 1.2 % of the total nitrogen amount

in the form of albumin II; yet, although this figure is not very high, we do not succeed in completing the conversion of albumin even after a whole hour's initial mashing at 45°. A further prolongation of the initial mashing will doubtless prove fatal in other directions, since at 45° there are the greatest chances of bacterial growths developing freely and doing harm. Thus, we shall certainly be justified to a certain extent in using the duration of initial mashing to regulate an incomplete albumin conversion in germination; but, on the other hand, we must be aware that this regulator can be utilised only within rather narrow limits if it is not going to work mischief in other directions.

If initial mashing is carried out at a temperature lower than 45°, the influence of time will of course be protracted, but not impaired: if the temperature is higher than 45°, it will be to the detriment of all the proteïd transformation processes, save the peptic action, the optimum of which is about 55°, and we shall not be able to derive any positive benefit from this mashing factor.

The right duration of initial mashing exerts a favorable influence on the various transformations taking place during the principal mashing, and more particularly on the albumin conversion process[1]).

[1] After my experiments had been completed and that part of my manuscript which deals with mashing and wort boiling had been copied fair, there appeared a paper by W. Windisch and H. Keiser (Wochenschr. für Brauer. **29**, 273, 288, 299, 313, 326 [1912]) which, especially with regard to the question as to the importance of preparatory mashing to proteïd transformation, goes somewhat farther than my experiments. The results arrived at by Windisch and Keiser coïncide entirely with those which I have obtained, at any rate as far as the qualitative side of the action is concerned, whilst in regard to albumin conversion these inquirers get a far higher quantitative result than I. The reason lies in the circumstance that they worked with short malt (Kurz-Malz), that is to say, a malt which has been subjected only to a limited germination — four days and a half —, whereas I have been working throughout with a nearly ready-germinated malt (Lang-Malz), the germination of which has been conducted for so long a time (8—9 days) that the whole of the proteïd transformation has been practically brought to a close in the course of germination.

(e) Duration of Boiling.

(See VI Series of Experiments, p. 244).

On examining the different series of figures in Table XXIX it will be seen that only two of them are noticeably influenced during the boiling of the mash, namely the quantities of albumins I and II. It is evident that corresponding changes are brought about in the values relating to the processes of proteïd dissolution[1]) and albumin conversion. As for all the other numerical series, on the contrary, the changes are so small that we may safely regard them as experimental errors.

TABLE XXIX.

100 gr. of malt dry matter contains 1.60 gr. of total nitrogen and 2.38 gr. of total ash.

Column marks	A	B	C	A_I	A_{II}	D	E	F	G	H	N	$\frac{N}{A_{II}}$	$\frac{P}{T}$	T
After the Normal Mashing is finished, the mixture is boiled for	% of extract of malt dry matter	100 gr. of dry matter contains		% of total nitrogen of malt is found in the form of							Numerical value of the processes, in proportion to total nitrogen			
		gr. of soluble ash	Acid ∞ cc. of norm. NaOH	Albumin		peptic cleavage products = P			tryptic cleavage prod. = T		Proteïd dissolution	Albumin conversion	Peptic action	Tryptic action
				I	II	Deuteroalbumin	Proteose	Peptone	Ammonia	Amine-Amid				
Without boiling (70°)	78.84	1.25	9.1	7.6	0	5.0	1.5	1.9	0.6	21.9	38.5	38.5	30.9	22.5
1 minute	79.04	1.25	9.1	7.2	0	5.0	1.9	1.9	0.6	22.2	38.8	38.8	31.6	22.8
10 minutes	78.73	1.21	9.1	5.7	0.8	4.9	1.9	1.6	0.6	22.6	38.1	37.3	31.6	23.2
20 minutes	78.84	1.24	9.1	5.3	1.2	4.2	1.9	1.9	0.8	22.0	37.3	36.1	30.8	22.8
Analytical errors	0.2	0.06	0.4	0.7					0.4		0.4—0.7			

If neither the peptic nor the tryptic action is influenced during the boiling of the mash, it is evident that the decrease in the amount of albumin I which occurs in the course of boiling must be attributable to albumin I being either converted into albumin II or coagulated out. Now, since the quantity of albumin II increases as boiling progresses, although the amount of total soluble nitrogen (N) decreases, it appears to be an obvious conclusion that the processes marked (1) and (2) in the scheme p. 279 (proteïd dissolution and albumin conversion, respectively) become reciprocal in the progress of boiling. If this explanation

[1]) O. Pankrath, Wochenschr. f. Brauer. **27**, 526 (1910).

is correct, it appears from Table XXIX that of the 1.5 % of albumin I which disappears during boiling from 1 to 10 minutes, 0.7 % must have coagulated out, the remaining 0.8 % being converted into albumin II. This conclusion agrees perfectly with the fact that the amount of total soluble nitrogen (N) diminishes by 0.7 % within the same time. On the contrary, if we keep on boiling, from 10 to 20 minutes, the amount of albumin I will decrease by 0.4 %, whilst at the same time the amount of albumin II will increase by 0.4 %. Thus, during this period of boiling nothing would have coagulated out; but nevertheless we find that the quantity of total soluble nitrogen decreases by 0.8 %.

Thus, in the first period of boiling we find a perfect accordance between the experimental results and the explanation proposed above, whereas the second period shows a discrepancy amounting to 0.8 %. If, however, proper allowance is made for the experimental error, it will be seen that all the established facts go to prove the correctness of the above explanation, according to which albumin I in the course of the boiling of the mash is converted to a greater or less extent into albumin II, which in its turn coagulates out partially. Consequently, the direct boiling of the mash may result in the albumin conversion process becoming reciprocal[1]).

On the contrary, the yield of extract, amount of mineral constituents, acidity, peptic and tryptic actions are affected only very slightly, if at all, in the boiling of mash.

Finally, it deserves notice that the faculty of clarification of the wort diminishes as the time during which the mash is boiled is prolonged. In the case here before us the clarifying faculty had lessened noticeably already after 10 minutes' boiling, and very much after 20 minutes'.

f) Elutriation of Husks.

(See VII Series of Experiments, p. 246).

An inspection of the columns in Table XXX will show that almost all of them increase more or less as the washing of the

[1]) This process has been shown formerly to become reciprocal in over-germination. Compt. rend. des travaux du Laborat. de Carlsb. **8**, 317 (1910).

husks progresses; yet we do not in all the series attain the maximum after the same number of washings. The general impression arrived at is that nitrogenous matters can be washed quicker than carbohydrates, mineral constituents and acid compounds.

TABLE XXX.

100 gr. of malt dry matter contains 1.60 gr. of total nitrogen and 2.38 gr. of total ash.

Column marks	A	B	C	A_I	A_{II}	D	E	F	G	H	N	$\frac{N}{A_{II}}$	$\frac{P}{T}$	T
Normal Mashing. The husks elutriated — times with distilled water, each time 50 cc.	% of extract of malt dry matter	100 gr. of dry matter contains		% of total nitrogen of malt is found in the form of							Numerical values of the processes, in proportion to total nitrogen			
		gr. of soluble ash	Acid ∞ cc. of norm. NaOH	Albumin		peptic cleavage products = P			tryptic cleavage prod. = T					
				I	II	Denucleïn	Proteose	Peptone	Ammonia	Amine-Amid	Proteïd dissolution	Albumin conversion	Peptic action	Tryptic action
0	64.38	1.03	7.9	3.1	2.9	3.7	1.6	3.0	0.6	17.7	32.6	29.7	26.6	18.3
1	69.18	1.08	8.3	3.4	2.3	4.8	2.1	2.7	0.8	18.8	34.9	32.6	29.2	19.6
2	70.33	1.15	8.5	4.4	2.1	4.2	1.7	3.4	0.6	—	—	—	—	—
3	73.19	—	8.9	4.4	2.7	4.4	1.5	2.8	0.6	19.1	35.5	32.8	28.4	19.7
Analytical errors	0.2	0.06	0.4	0.7					0.4		0.4—0.7			

The main point to be cleared up by this experiment, however, is of course the question as to whether the extract obtained changes in composition according as the washing is more or less

TABLE XXXI.

Column marks	B	C	A_I	A_{II}	D	E	F	G	H	N	$\frac{N}{A_{II}}$	$\frac{P}{T}$	T
Normal Mashing. The husks elutriated — times with distilled water, each time 50 cc.	100 gr. of extract contains									Numerical values of the processes			
	gr. of soluble ash	Acid ∞ cc. of norm. NaOH	gr. of nitrogen in the form of										
			Albumin		peptic decomposition products = P			tryptic decomposition prod. = T					
			I	II	Denucleïn	Proteose	Peptone	Ammonia	Amine-Amid	Proteïd dissolution	Albumin conversion	Peptic action	Tryptic action
0	1.60	12.3	0.08	0.07	0.09	0.04	0.07	0.02	0.44	0.81	0.74	0.66	0.46
1	1.56	12.0	0.08	0.05	0.11	0.05	0.06	0.02	0.44	0.81	0.76	0.68	0.46
2	1.64	12.1	0.10	0.05	0.10	0.04	0.08	0.01	—	—	—	—	—
3	—	12.1	0.10	0.06	0.10	0.03	0.06	0.01	0.42	0.78	0.72	0.62	0.43
Analytical errors	0.06	0.4	0.02					0.01		0.01—0.02			

intense. In order to answer this question I have, from Table XXX, calculated the composition per cent of the extract, bringing together the figures obtained in Table XXXI.

From these figures it may be calculated that the composition per cent of the extract is not affected to a noticeable degree by washing out the husks three times with distilled water at the ordinary temperature[1]). It is to be remarked, however, that the washing out of peptic and tryptic decomposition products manifestly goes off quicker than that of the other extractive matters.

g) The Salt Effect.

(See VIII Series of Experiments, p. 248).

All the experimental results are brought together in Table XXXII (p. 314—15). We should certainly not be justified in drawing any direct conclusions from these figures, because the experiments cannot without a certain reservation be compared with one another, owing chiefly to the fact that a normal mashing of the same material, if repeated several times, will not always give exactly the same idea of the chemical changes taking place during mashing. The experiments here mentioned extended over a comparatively long space of time, and, since I worked throughout with the same object, this may obviously have undergone slight changes during preservation. It is also evident that it is not possible over and over again to undertake a normal mashing without some slight irregularities in the operations, particularly in regard to the time it takes to raise the mashing temperature from 45° to 70° (see p. 252). That such circumstances are liable to influence the processes in the different experiments, is a matter of course.

As each experiment consists of a control mashing (with distilled water and two or three mashings with the salt solution concerned, we are thus enabled to calculate the salt effect in each experiment, and it is evident that these figures can with perfect surety be compared from one experiment to another, because they are not affected by the before mentioned sources of

[1]) H. T Brown finds that the amount of permanently soluble nitrogen increases if water of 87.7° is used. Journ. Instit. of Brew. **15**, 212 (1909).

error. The figures are brought together in Table XXXIII p. 316—17).

Taking Table XXXIII as the starting point for the following considerations, it will first be seen that the figures representing acidity (C) and those expressing the exponents of hydrogen ions (p_H) do not stand in any direct relation of interdependence to each other. This is self-evident since the acidity figures denote the quantitative change in the acidity, whereas the exponents referred to mark the change in the degree of dissociation of the acids, bases and salts present. When the exponent decreases (that is, when the concentration of hydrogen ions increases), the acidity increases. But no constant relation is found to exist between these two changes. Thus, for instance, in the undermost series relating to Experiment I we find the acidity to have decreased by the value 7.0 and the exponent of hydrogen ions increased by 0.8, whilst in Experiment II, corresponding series, where the acidity has likewise decreased by 7.0, the said exponent is seen to have increased only by 0.4, and so forth. Hence it appears that acidity and hydrogen ion concentration are two different factors the influence of which upon the transformations going on during mashing cannot be supposed to be parallel, even though they are in a measure mutually interdependent Different kations and different anions are also likely to influence the transformations differently, at any rate for the reason that they may react in different ways upon the salts existing in the malt (mainly phosphates). For the same reason it is also to be expected that different quantities of salt may influence the mashing transformations in somewhat different ways and to different extents. Thus it becomes evident that we have to count with at least five different factors if we wish to inquire into the manner in which and the extent to which the mashing transformations are influenced by different salts (as well as acids and bases). These factors are: — The amount of salt (the direct salt effect), the concentration of hydrogen ions, the acidity, and the character of anions and kations.

In the Experiments VI and VII (Table XXXIII) the mashing water has received an addition of salts by which neither the hydrogen ion concentration nor the acidity of the wort is changed.

TABLE XXXII

100 gr. of malt dry matter contains 1.74 gr. of total nitrogen and 2.36 gr. of total ash.

Column marks					A		B		C	A_I	A_{II}	D	E	F	G	H	N	$\frac{N}{A_{II}}$	$\frac{P+I}{I}$	T	G	
Experiment N	Added to mashing water	1000 cc. of mashing water contains: gr. of salt	1000 cc. of mashing water contains: gr.-equivalents of salt	pH measured in the mashing water before the experiment	100 gr. of malt dry matter contains: gr. of extract calculated without salt correction	100 gr. of malt dry matter contains: gr. of extract calculated with salt correction	100 gr. of malt dry matter contains: gr. of soluble ash calculated without salt correction	100 gr. of malt dry matter contains: gr. of soluble ash calculated with salt correction	Acid = cc. of norm. NaOH	% of total nitrogen of the malt is found in the form of: Albumin I	Albumin II	peptic decomposition products = P: Dextrin	Peptone	Pept. nc	tryptic decomposition prod. = T: Ammonia	Amide Amid	Numerical values of the processes: Proteid dissolution	Albumin conversion	Peptic action	Tryptic action	Peptid splitting	pH measured in dilute wort	Clarification of the wort
I	Control			—	79.05	79.05	1.41	1.41	10.9	3.9	3.4	3.6	2.5	3.5	0.7	19.7	37.3	33.9	30.0	20.4	12.0	6.1	excellent
	NaOH	0.20	1/200	—	78.53	78.43	1.31	1.23	8.7	4.2	3.5	3.2	2.5	2.8	0.7	19.3	36.2	32.7	28.5	20.0	11.2	6.2	very good
		0.40	1/100	—	78.02	77.80	1.22	0.98	7.0	4.9	2.9	2.8	2.8	1.7	0.7	18.3	34.1	31.2	26.3	19.0	10.9	6.5	good
		0.80	1/50	—	70.44	70.19	—		3.9	10.2	0.4	3.5	2.8	1.4	0.7	16.2	35.2	34.8	24.6	16.9	9.5	6.9	pretty good
II	Control			—	79.09	79.09	1.40	1.40	11.4	4.6	3.2	3.5	2.1	4.6	0.7	17.9	36.6	33.4	28.8	18.6	11.6	6.1	excellent
	$Ca(OH)_2$	0.19	1/200	—	78.45	78.39	1.18	1.12	8.3	3.9	2.9	3.1	3.1	3.5	19.8		36.3	33.4	29.5	19.8	10.6	6.1	very good
		0.37	1/100	—	77.72	77.57	1.05	0.92	6.1	3.9	1.8	3.1	4.2	2.1	19.0		34.1	32.3	28.4	19.0	9.9	6.2	good
		0.74	1/50	—	77.10	76.78	0.97	0.70	4.4	4.6	1.3	2.5	4.3	1.4	0.7	17.6	32.4	31.1	26.5	18.3	9.2	6.5	pretty good
III	Control			—	79.02	79.02	1.43	1.43	10.9	3.5	4.2	3.9	1.8	3.8	0.7	19.7	37.6	33.4	29.9	20.4	11.3	6.1	excellent
	$Mg(HCO_3)_2$	0.37	1/200	—	78.61	78.56	1.37	1.32	8.7	3.9	3.1	3.6	2.8	3.5	0.7	19.3	36.9	33.8	29.9	20.0	11.3	6.1	»
		0.73	1/100	—	78.20	78.09	1.18	1.08	7.4	3.5	3.9	2.8	2.8	3.2	0.7	18.3	35.2	31.3	27.8	19.0	10.9	6.2	very good
		1.46	1/50	—	77.67	77.45	0.92	0.73	4.4	4.6	3.1	2.1	2.9	2.4	0.7	18.7	34.5	31.4	26.8	19.4	10.6	6.4	good
IV	Control			—	79.13	79.13	1.46	1.46	10.9	3.9	4.5	3.2	1.4	4.6	0.7	19.3	37.6	33.1	29.2	20.0	12.3	6.1	excellent
	HCl	0.18	1/200	—	79.77	79.67	1.59	1.50	12.7	3.2	5.2	3.6	1.4	5.6	0.7	21.5	41.2	36.0	32.8	22.2	13.0	6.0	»
		0.37	1/100	—	80.39	80.19	1.63	1.46	14.4	3.2	5.6	3.9	1.4	6.0	0.7	22.8	43.6	38.0	34.8	23.5	13.7	5.6	»
		0.73	1/50	—	79.24	78.82	1.67	1.33	17.5	3.2	3.9	4.2	2.4	6.0	0.7	24.3	44.7	40.8	37.6	25.0	14.4	5.3	»
V	Control			—	79.13	79.13	1.37	1.37	11.8	3.9	4.5	3.2	1.4	5.0	0.5	19.1	37.6	33.1	29.2	19.6	12.0	6.1	excellent
	H_2SO_4	0.25	1/200	—	79.87	79.77	1.51	1.39	13.6	3.5	5.2	3.6	1.1	5.6	0.7	21.1	40.8	35.6	32.1	21.8	12.7	6.0	»
		0.49	1/100	—	80.50	80.29	1.54	1.31	16.2	3.5	6.7	3.2	0	7.0	0.5	23.1	44.0	37.3	33.8	23.6	13.4	5.5	»
		0.98	1/50	—	79.24	78.72	1.60	1.14	18.8	3.5	3.5	5.3	1.8	6.0	0.5	24.1	44.7	41.2	37.7	24.6	13.4	5.3	»
VI	Control			7.1	78.64	78.64	1.33	1.33	10.0	3.5	4.9	3.8	1.4	2.8	0.7	20.9	38.0	33.1	29.6	21.6	9.8	6.1	excellent
	NaCl	0.58	1/100	6.2	79.36	79.16	1.36	1.07	10.0	3.5	4.5	4.2	1.8	3.1	21.3		38.4	33.9	30.4	21.3	10.4	6.1	»
		1.17	1/50	6.2	79.68	79.06	1.65	1.08	9.5	4.5	3.5	4.2	2.1	2.4	22.0		38.7	35.2	30.7	22.0	9.8	6.1	»

VII	Control			7.1	78.55	78.55	1.32	1.32	9.9	3.1	4.5	3.9	2.1	2.4	21.6		37.6	33.1	30.0	21.6	11.1	6.1	excellent
	Na_2SO_4	0.35	1/200	6.2	79.38	79.18	1.31	1.12	9.9	3.1	4.9	4.2	1.7	2.8	0.5	21.1	38.3	33.4	30.3	21.6	11.5	6.1	»
		1.42	1/50	6.1	80.31	79.48	1.42	0.66	9.9	3.8	3.9	4.5	2.4	1.8	0.5	21.4	38.3	34.4	30.6	21.9	11.5	6.1	»
VIII	Control			7.1	79.07	79.07	—	—	10.5	3.9	3.9	3.5	2.1	3.9	0.7	20.8	38.8	34.9	31.0	21.5	11.7	6.1	excellent
	$CaCl_2$	0.28	1/200	5.2	79.18	79.07	—	—	10.5	3.5	4.3	3.9	1.7	4.2	0.7	21.2	39.5	35.2	31.7	21.9	11.7	6.0	»
		0.55	1/100	4.5	79.07	78.75	—	—	11.0	3.2	3.1	4.6	3.6	3.1	0.5	22.8	40.9	37.8	34.6	23.3	12.0	5.9	»
		1.11	1/50	3.8	79.69	79.07	—	—	11.0	4.2	2.2	4.9	3.5	3.6	0.7	24.7	43.8	41.6	37.4	25.4	12.0	5.7	»
IX	Control			7.1	78.93	78.93	1.33	1.33	10.5	3.5	3.9	4.2	2.5	2.8	0.7	20.4	38.0	34.1	30.6	21.1	11.2	6.1	excellent
	$CaSO_4$	0.34	1/200	5.6	79.15	78.93	1.33	1.17	10.5	3.9	3.5	3.9	2.1	3.5	0.7	20.8	38.4	34.9	31.0	21.5	11.2	6.0	»
		0.68	1/100	5.6	79.36	79.04	1.32	0.99	10.5	3.5	2.5	5.3	3.5	3.2	0.7	21.8	40.5	38.0	34.5	22.5	12.0	5.9	»
		1.36	1/50	5.6	80.19	79.46	1.25	0.60	10.9	3.2	3.6	4.5	3.1	3.6	24.3		42.3	38.7	35.5	24.3	12.3	5.8	»
X	Control			7.1	78.74	78.74	1.36	1.36	10.5	3.2	5.2	3.5	1.1	4.2	0.5	20.8	38.5	33.3	30.1	21.3	10.5	6.1	excellent
	$MgCl_2$	0.24	1/200	3.3	79.15	79.06	1.42	1.32	10.5	4.2	4.6	3.8	0.7	3.9	22.5		39.7	35.1	30.9	22.5	10.5	6.0	»
		0.48	1/100	2.8	79.47	79.26	—	—	10.9	3.5	5.0	3.8	1.0	4.6	0.5	22.3	40.7	35.7	32.2	22.8	10.9	5.9	»
		0.95	1/50	2.6	80.00	79.49	1.58	1.14	10.5	3.2	4.5	4.2	2.1	4.6	0.5	23.7	42.8	38.3	35.1	24.2	11.6	5.7	»
XI	Control			7.1	79.09	79.09	1.38	1.38	10.1	3.5	4.6	3.5	1.4	3.9	0.7	20.8	38.4	33.8	30.3	21.5	10.9	6.1	excellent
	$MgSO_4$	0.30	1/200	5.6	79.42	79.21	1.46	1.31	10.1	3.2	4.2	4.2	2.1	3.5	0.7	21.5	39.4	35.2	32.0	22.2	11.6	6.0	»
		0.60	1/100	5.6	79.83	79.52	—	—	10.1	3.2	4.5	3.9	1.8	4.2	0.7	21.8	40.1	35.6	32.4	22.5	12.0	5.9	»
		1.20	1/50	5.5	80.56	79.94	1.55	0.98	10.5	3.5	4.0	4.5	2.4	3.6	0.5	22.3	40.8	36.8	33.3	22.8	12.7	5.8	»
XII	Control			7.1	78.62	78.62	1.42	1.42	10.5	4.9	3.2	3.8	1.4	3.6	0.7	20.3	37.9	34.7	29.8	21.0	11.2	6.1	excellent
	Na_3PO_4	0.82	3/200	11.4	78.43	78.01	1.57	1.19	8.3	6.0	(3.5)	(3.5)	(0.7)	(2.5)	0.7	(17.9)	34.8	(31.3)	(25.3)	(18.6)	10.2	6.4	very good
		1.64	3/100	11.7	73.86	73.03	1.86	1.09	6.5	8.1	(3.5)	(3.5)	(0)	(1.8)	0.9	(16.3)	34.1	(30.6)	(22.5)	(17.2)	9.5	6.8	pretty good
		3.28	3/50	12.0	61.39	59.77	—	—	3.9	8.4	(7.8)				(14.7)		30.9	—	—	(14.7)	—	7.2	bad
XIII	Control			7.1	78.70	78.70	1.36	1.36	10.5	3.5	5.3	3.1	0.7	4.3	0.7	20.0	37.6	32.3	28.8	20.7	10.9	6.1	excellent
	Na_2HPO_4	0.71	3/200	8.2	78.90	78.60	—	—	10.0	5.6	(3.5)	(3.2)	(0.7)	(3.5)	0.7	(19.0)	36.2	(32.7)	(27.1)	(19.7)	10.5	6.3	very good
		1.42	2/100	8.5	79.12	78.38	1.81	1.18	10.0	6.0	(4.5)	(2.5)	(0)	(3.5)	0.7	(17.6)	34.8	(30.3)	(24.3)	(18.3)	10.5	6.6	»
		2.84	3/50	8.7	77.44	76.09	2.35	1.08	10.0	7.4	(3.5)	(3.5)	(0)	(2.5)	0.7	(16.5)	34.1	(30.0)	(23.2)	(17.2)	10.5	6.8	»
XIV	Control			7.1	79.13	79.13	1.39	1.39	10.5	3.5	3.9	4.6	2.1	2.8	0.7	20.0	37.6	33.7	30.2	20 7	11.9	6.0	excellent
	NaH_2PO_4	0.60	3/200	5.1	79.66	79.34	—	—	12.2	3.9	4.2	4.2	1.8	(3.8)	0.7	(20.4)	39.0	(34.8)	(30.9)	(21.1)	11.6	6.0	»
		1.20	3/100	5.1	80.42	79.87	1.94	1.46	14.4	4.9	3.2	4.2	1.8	(4.5)	0.7	(20.1)	39.4	(36.2)	(31.3)	(20.8)	11.6	5.9	»
		2.40	3/50	4.7	81.45	80.04	2.36	1.39	17.9	5.6	1.8	5.6	2.5	(3.8)	0.5	(20.7)	40.5	(38.7)	(33.1)	(21.2)	11.6	5.8	»
Analytical errors					0.2		0.06		0.4	0.7					0.4		0.4—0.7					0.1	

TABLE XXXIII.

Experiment N°	Added to mashing water		1000 cc of mashing water contains: gr. of salt	gr.-equivalents of salt	A: Salt effect during mashing expressed as % of extract of malt dry matter calculated, without salt correction	A: with salt correction	B: Salt effect during mashing expressed as gr. of soluble ash of 100 gr. of malt dry matter calculated, without salt correction	B: with salt correction	C: Acid ∞ cc of norm. NaOH	N: Numerical values of the processes: Protein dissolution	N÷AII: Albumin conversion	P+T: Peptic action	T: Tryptic action	G: Ammonia separation	O: Peptid splitting	Fluctuation of PH measured in different wort
I	NaOH	a	0.20	1/200	÷0.52	÷0.62	÷0.10	÷0.18	÷2.2	÷1.1	÷1.2	÷1.5	÷0.4	0	÷0.8	0.1
		b	0.40	1/100	÷1.03	÷1.25	÷0.19	÷0.43	÷3.9	÷3.2	÷2.7	÷3.7	÷1.4	0	÷1.1	0.4
		c	0.80	1/50	÷8.61	÷8.86	—	—	÷7.0	÷2.1	0.9	÷5.4	÷3.5	0	÷2.5	0.8
II	$Ca(OH)_2$	a	0.19	1/200	÷0.64	÷0.70	÷0.22	÷0.28	÷3.1	÷0.3	0	0.7	1.2	—	÷1.0	0
		b	0.37	1/100	÷1.37	÷1.52	÷0.35	÷0.48	÷5.3	÷2.5	÷0.3	÷0.4	0.4		÷1.7	0.1
		c	0.74	1/50	÷1.99	÷2.31	÷0.43	÷0.70	÷7.0	÷4.2	÷2.3	÷2.3	÷0.3	0	÷2.4	0.4
III	$Mg(HCO_3)_2$	a	0.37	1/200	÷0.41	÷0.46	÷0.06	÷0.11	÷2.2	÷0.7	0.4	0	÷0.4	0	0	0
		b	0.73	1/100	÷0.82	÷0.93	÷0.25	÷0.035	÷3.5	÷2.4	÷2.1	÷2.1	÷1.4	0	÷0.4	0.1
		c	1.46	1/50	÷1.35	÷1.57	÷0.51	÷0.70	÷6.5	÷3.1	÷2.0	÷3.1	÷1.0	0	÷0.7	0.3
IV	HCl	a	0.18	1/200	0.64	0.54	0.13	0.04	1.8	3.6	2.9	3.6	2.2	0	0.7	÷0.1
		b	0.37	1/100	1.26	1.06	0.17	0	3.5	6.0	4.9	5.6	3.5	0	1.4	÷0.5
		c	0.73	1/50	0.11	÷0.31	0.21	÷0.13	6.6	7.1	7.7	8.4	5.0	0	2.1	÷0.8
V	H_2SO_4	a	0.25	1/200	0.74	0.64	0.14	0.02	1.8	3.2	2.5	2.9	2.2	0.2	0.7	÷0.1
		b	0.49	1/100	1.37	1.16	0.17	÷0.06	4.4	6.4	4.2	4.6	4.0	0	1.4	÷0.6
		c	0.98	1/50	0.11	÷0.41	0.23	÷0.23	7.0	7.1	8.1	8.5	5.0	0	1.4	÷0.8
VI	NaCl	b	0.58	1/100	0.72	0.52	0.03	÷0.26	0	0.4	0.8	0.8	÷0.3	—	0.6	0
		c	1.17	1/50	1.04	0.42	0.32	÷0.25	÷0.5	0.7	2.1	1.1	0.4	—	0	0

VII	Na_2SO_4	a	0.55	1/200	0.03	0.03	÷0.01	÷0.20	0	0.7	0.3	0.3	0	—	0.4	0
		c	1.42	1/50	1.76	0.93	0.10	÷0.66	0	0.7	1.3	0.6	0.3	—	0.4	0
VIII	$CaCl_2$	a	0.28	1/200	0.11	0	—	—	0	0.7	0.3	0.7	0.4	0	0	÷0.1
		b	0.55	1/100	0	÷0.32	—	—	0.5	2.1	2.9	3.6	1.8	÷0.2	0.3	÷0.2
		c	1.11	1/50	0.62	0	—	—	0.5	5.0	6.7	6.4	3.9	0	0.3	÷0.4
IX	$CaSO_4$	a	0.34	1/200	0.22	0	0	÷0.16	0	0.4	0.8	0.4	0.4	0	0	÷0.1
		b	0.68	1/100	0.43	0.11	÷0.01	÷0.34	0	2.5	3.9	3.9	1.4	0	0.8	÷0.2
		c	1.36	1/50	1.26	0.53	÷0.08	÷0.73	0.4	4.3	4.6	4.9	3.2	—	1.1	÷0.3
X	$MgCl_2$	a	0.24	1/200	0.49	0.32	0.06	÷0.04	0	1.2	1.8	0.8	1.2	—	0	÷0.1
		b	0.48	1/100	0.73	0.52	—	—	0.4	2.2	2.4	2.1	1.5	0	0.4	÷0.2
		c	0.95	1/50	1.26	0.75	0.22	÷0.22	0	4.3	5.0	5.0	2.9	0	1.1	÷0.4
XI	$MgSO_4$	a	0.30	1/200	0.33	0.12	0.08	÷0.07	0	1.0	1.4	1.7	0.7	0	0.7	÷0.1
		b	0.60	1/100	0.74	0.43	—	—	0	1.7	1.8	2.1	1.0	0	1.1	÷0.2
		c	1.20	1/50	1.47	0.85	0.17	÷0.40	0.4	2.4	3.0	3.0	1.3	÷0.2	1.8	÷0.3
XII	Na_3PO_4	a	0.82	3/200	÷0.19	÷0.61	0.15	÷0.23	÷2.2	÷3.1	(÷3.4)	(÷4.5)	(÷2.4)	0	÷1.0	0.3
		b	1.64	3/100	÷4.76	÷5.59	0.44	÷0.33	÷4.0	÷3.8	(÷4.1)	(÷7.3)	(÷3.8)	0.2	÷1.7	0.7
		c	3.28	3/50	÷7.23	÷8.85	—	—	÷6.6	÷7.0	—	—	(÷6.3)	—	—	1.1
XIII	Na_2HPO_4	a	0.71	3/200	0.20	÷0.10	—	—	÷0.5	÷1.4	(0.4)	(÷1.7)	(÷1.0)	0	÷0.4	0.2
		b	1.42	3/100	0.42	÷0.32	0.45	÷0.18	÷0.5	÷2.8	(÷2.0)	(÷4.5)	(÷2.4)	0	÷0.4	0.5
		c	2.84	3/50	÷1.26	÷2.61	0.99	÷0.28	÷0.5	÷3.5	(÷1.7)	(÷5.6)	(÷3.5)	0	÷0.4	0.7
XIV	NaH_2PN_4	a	0.60	3/200	0.53	0.21	—	—	1.7	1.4	1.1	(0.7)	(0.4)	0	÷0.3	0
		b	1.20	3/100	1.29	0.74	0.55	0.07	3.9	1.8	2.5	(1.1)	(0.1)	0	÷0.3	÷0.1
		c	2.40	3/50	2.32	0.91	0.97	0	7.4	2.9	5.0	(2.9)	(0.5)	÷0.2	÷0.3	÷0.2
Analytical errors					0.2		0.06		0.4	0.4—0.7						0.1

All figures without signs are positive.

If, therefore, we consider these two experiments separately, we find that only the salt amount is variable. Accordingly, the changes met with in the experiments referred to can only originate in the effect exerted by the added salt amounts upon the various conversion processes. In Experiment VI the amount of extract increases by 0.53 and 0.42, the albumin conversion process by 0.8 and 2.1, and the peptic action by 0.8 and 1.1, respectively, whereas the other transformation processes are not affected to any extent surpassing the experimental error. Quite similar results are obtained in Experiment VII. We are thus warranted in drawing the conclusion that the only transformation processes that are noticeably furthered by the salt amount itself (the direct salt effect) are the carbohydrate transformation (diastatic action?), the albumin conversion and perhaps also the peptic action, whereas the other proteid transformation processes remain unaffected by this factor, or at all events are not affected to any extent that would enable us to measure the action by means of the methods used. The direct salt effect is therefore in reality quite inconsiderable. Where the maximum lies, cannot be inferred from these experiments.

By following one by one the experiments VIII, IX, X, XI and XIII, we shall be able to judge of the way in which the transformation processes are influenced by the concentration of hydrogen ions. In fact, the figures denoting acidity are seen to fluctuate so inconsiderably in these experiments, that we are justified in entirely setting aside this factor, and, furthermore, the anions and kations are identical respectively. Thus, the only variables are the hydrogen ion concentration and the salt amount. Now, the latter factor has been shown to only slightly influence (increase) the conversion of carbohydrates and albumin and perhaps the peptic action. In the experiments VIII, IX, X and XI the salt amount is by no means greater than that with which we worked in our experiments VI and VII. If, therefore, in regard to the influence exerted upon the various transformation processes, the former experiments (VIII, IX, X and XI) give a greater turning than the latter (VI and VII), it has thus been established that the hydrogen ion concentration exerts an influence — whether positive or negative — on the transformations which take place in the course of mashing. In experiment XIII

the salt amounts are superior to those of experiments VI and VII; but experiment XIII shows that the various transformation processes are impaired throughout, and consequently the influence of hydrogen ion concentration must here be found to be less than it is in reality, since it is diminished by the value answering to the promoting influence of the salt amount present. We may therefore safely avail ourselves of these experiments to show, what quantitative influence the hydrogen ion concentration has upon the transformation processes in question. If we try to solve the problem on the basis of experiments VIII, IX, X, XI and XIII, it will at once become conspicuous that, as soon as the hydrogen ion concentration increases, that is when p_H decreases, the various proteïd transformation processes increase by far greater values than those answering to the favourable action of the actual salt amount. If, on the contrary, the hydrogen ion concentration is reduced, that is, if p_H increases, all the proteïd transformation processes are noticeably checked, and this effect is indubitably greater than that exhibited by the experimental figures, since — as has been pointed out above — the direct salt action goes in the opposite direction.

It is, however, to be observed that the peptid splitting (O) is influenced (promoted) only in those cases in which magnesium or sulphate ions were added, so that it is perhaps in reality not influenced at all by the hydrogen ion concentration, but somewhat influenced by the kations or anions present. It will be further seen that even the ammonia liberation process (G) is not influenced by the hydrogen ion concentration; indeed, this process is not influenced by any of the above-mentioned factors at all.

Finally, it may be mentioned that the transformation of carbohydrates (A) increases or decreases, according as the hydrogen ion concentration increases or decreases. An exception to this rule is met with in experiment VIII, probably because this process is influenced by either the kation or the anion, or perhaps both. But enough of this for the present.

Thus we find that the hydrogen ion concentration is apt to influence the transformation of carbohydrates and all the proteïd transformation processes, excepting ammonia liberation. The influence rises and falls as the hydrogen ion concentration rises or falls; quan-

titatively it is pretty considerable, and it is always greater in regard to the peptic than to the tryptic action. The cardinal points cannot therefore be established by means of experiments where the whole action is of such a complex nature as is the case in the present work. Only this much can be stated, that the maximum effect requires a hydrogen ion concentration superior $0.122 \times 10^{\div 5}$ ($p_H = 5.8$), and the minimum effect a concentration inferior to $0.122 \times 10^{\div 7}$ ($p_H = 6.8$).

It is not an easy matter to ascertain, to what extent and in what way the acidity (C) influences the transformations taking place in the mashing process, because the hydrogen ion concentration is nearly always noticeably influenced when the acidity changes. The only experiment in which I have been able to bring about considerable changes in the acidity without influencing the hydrogen ion concentration to any noticeable extent, is N° XIV[1], where the acidity has increased by 1.7—3.9—7.4, whilst the hydrogen ion exponent has diminished by only 0—0.1—0.2, respectively. This experiment shows that the carbohydrate transformation (A), the proteïd dissolution (N), the albumin conversion ($N \div A_{II}$) processes, and perhaps the peptic action ($P + T$) increase as the acidity increases, whereas the other transformation processes are not influenced. This increase in the transformation processes mentioned might, however, be due to the increased hydrogen ion concentration. But the experiments IX b, X b and XI b show that a diminution of 0.2 in the hydrogen ion exponent results in augmenting, respectively, the extract amount by 0.11—0.52—0.43, the proteïd dissolution process by 2.5—2.2—1.7, the albumin conversion process by 3.9—2.4—1.8, and the peptic action by 3.9—2.1—2.1, whilst in experiment XIV c (where the hydrogen ion concentration is the same as in the first-mentioned experiments) the increase amounts to 0.91—2.9—5.0—2.9 for the extract formation (A), proteïd dissolution process (N), albumin conversion process ($N \div A_{II}$) and peptic action ($P + T$), respectively. Thus, there remains a decided plus in the case of extract formation (carbohydrate transformation) and albumin conversion, which must arise from the action of the increased acidity, whilst the increases found in the proteïd dissolution process and peptic action are undoubtedly to be attributed to the influence of the increased hydrogen ion concentration.

[1]) As regards the figures in brackets, I refer the reader to p. 252.

The main result is therefore that the transformation of carbohydrates and the conversion of albumin II into albumin I are influenced by the acidity and are changed in the same direction, whereas the other proteïd transformation processes remain unaffected. The influence of this factor is, however, not very great.

In order to ascertain how different anions modify the transformation processes in mashing, we may compare the experiments VI c and VII c; VIII a, b and IX a, b; X a, b and XI a, b, since these series of experiments show the same hydrogen ion concentration, very nearly the same acidity, further the same kations and very nearly the same salt concentration, whilst containing alternately chlorine and sulphate ions in equivalent quantities.

Already a comparison of the two first-mentioned series of figures (VI c and VII c) proves that the same effect is exerted upon the aggregate transformation whether the anion be Cl^{I} or SO_4^{II}; it is only in the case of carbohydrate transformation that SO_4^{II} appears to act a little more vigorously than Cl^{I}. We arrive at quite similar conclusions by confronting the other two parallel series of experiments (VIII a, b with IX a, b or X a, b with IX a, b), and the same holds good, and perhaps still more markedly, if we compare the experiments IV and V with each other. Here again the only variable factor is the "anion"; since, however, the hydrogen ion concentration and the acidity increase more in these than in the first-mentioned experiments, we here get beyond the point where the carbohydrate transformation increases, so that we obtain a further corroboration of the conclusion arrived at above, namely that when the maximum of carbohydrate transformation is reached, a more markedly restraining effect will be exerted by SO_4^{II} than by Cl^{I} in equivalent quantity. These results warrant the conclusion that equivalent quantities of different anions exert exactly the same effect upon all the proteïd transformation processes, whereas a slight difference is perceptible in their power of reaction towards the carbohydrate transformation[1]). In the latter case the sulphate ion acts a little more vigorously than the chlorine ion, whether the effect be positive or negative.

[1]) C. Gerber, Compt. rend. Soc. Biol. **70**, 139, 391, 822 (1911); **71**, 41 (1911). H. Déel, *ibid.* **70**, 543 (1911).

With the view of obtaining an answer to the question as to whether different kations act differently upon the mashing transformations, we may confront the experiments VIII and X or IX and XI. In fact, within these two parallel series we encounter the same changes with respect to acidity and hydrogen ion concentration, as also the same anion and very nearly the same progressive increase of the salt amount. Thus the only variable factor is the kation. Table XXXIV gives a summary of

TABLE XXXIV.

Experiment		Transformation process				Carbohydrate transformation
		N	N÷A$_{II}$	P+T	T	
VIII ÷ X	a	÷ 0.5	÷ 1.5	÷ 0.1	÷ 0.8	÷ 0.32
	b	÷ 0.1	0.5	1.5	0.3	÷ 0.84
$CaCl_2$ ÷ $MgCl_2$	c	0.7	1.7	1.4	1.0	÷ 0.75
IX ÷ XI	a	÷ 0.6	÷ 0.6	÷ 1.3	÷ 0.3	÷ 0.12
	b	0.8	2.1	1.8	0.4	÷ 0.32
$CaSO_4$ ÷ $MgSO_4$	c	1.9	1.6	1.9	0.9	÷ 0.32
Analytical errors		0.4—0.7				0.2

All figures without signs are positive.

the relation between the effect exerted by the calcium and magnesium ions upon the various transformation processes. These figures are deduced from Table XXXIII. As compared with the analytical error, they are all but infinitesimal, and, moreover, so fluctuating with regard to their signs as not to warrant any definite conclusion. As far as carbohydrate transformation is concerned, no particular difficulty is encountered, as $Mg^{\cdot\cdot}$ is constantly found to react a little more intensely than $Ca^{\cdot\cdot}$. In all the proteïd transformation processes we meet with an entirely corresponding fact so long as we have to do with $^1/_{200}$ gr. equivalents of salt in 1000 cc. of mash water; but as soon as we reach higher concentrations, the case is entirely the reverse: $Ca^{\cdot\cdot}$ is now found to exercise a slightly stronger effect than $Mg^{\cdot\cdot}$. The difference between the effects of the two ions, however, is always very inconsiderable. Hence it would seem that the effect exerted during mashing by different kations upon carbohydrate transformation and the various proteïd transformation processes is well-nigh the same and only in an extremely small measure dependent on the chemical character of the kation.

Thus, the principal conclusion ultimately arrived at is, that equivalent quantities of different anions and different kations, respectively, exert the same quantitative influence upon the transformations which carbohydrates and proteïd substances undergo in the course of mashing[1]). Obviously, this only holds good if the anion or kation does not form any insoluble compounds with the substances upon which they react, and if they do not in any way impair or destroy the active power of the enzymes[2]).

If we compare the experiments I, II and III with IV and V, it appears that the kations and anions act in opposition to each other. As, however, all kations and all anions, respectively, have the same quantitative effect, the consequence would be that all salts would also have the same effect upon the mashing. But this does not agree either with the experiments here mentioned or with practical experience. The determining factor must therefore be sought in another direction, and principally, it would seem, in the manner in which the number of hydrogen ions and that of hydroxyl ions change in proportion to each other, or in the degree of dissociation of the bases, acids and salts present. The quantitative expression of this change is the hydrogen ion concentration As for the way in which the latter is influenced by various salts, it evidently depends partly on the faculty and degree of dissociation of the salts, and partly on the way in which they react with the salts present in the malt (chiefly phosphates and silicates). See p. 290.

Aqueous extracts of different malts always show very nearly the same hydrogen ion concentration ($p_H = 6.1$). Looking at it apart from the silicates contained in them, we may therefore assume that malt contains soluble phosphates in the approximate proportion $3\ Na_2\ HPO_4 + 17\ NaH_2\ PO_4$ (answering to 1.5 cc. sec. phosphate + 8 5 cc. prim. phosphate)[3]). With a phosphate mixture

[1]) The anions exert a favourable, the kations a restraining influence.

[2]) If, for example lead acetate, ferric acetate, uranium acetate or phosphotungstic acid is added to the mashing water, we shall of course get quite different results, because these kations and anions will partly be precipitated in the form of phosphates (from the malt), and partly precipitate certain soluble proteïd substances and render the enzymes inactive.

[3]) S. P. L. Sørensen, Compt. rend. des travaux du Laborat. de Carlsb. **8**, 1 (1909).

of this composition the reacting salts (the salts contained in the mashing water) may be supposed to act according to the following four equations:

(I)

$$3\,Na_2HPO_4 + 17\,NaH_2PO_4 + Na_2SO_4 = 3\,Na_2HPO_4 + 17\,NaH_2PO_4 + Na_2SO_4$$

(II)

$$3\,Na_2HPO_4 + 17\,NaH_2PO_4 + Na_2CO_3 = 5\,Na_2HPO_4 + 15\,NaH_2PO_4 + H_2O + \underbrace{CO_2}_{\text{volatile}}$$

(III)

$$3\,Na_2HPO_4 + 17\,NaH_2PO_4 + CaSO_4 = 2\,Na_2HPO_4 + 17\,NaH_2PO_4 + Na_2SO_4 + \underbrace{CaHPO_4}_{\text{indissoluble}}$$

(IV)

$$3\,Na_2HPO_4 + 17\,NaH_2PO_4 + CaCO_3 = 4\,Na_2HPO_4 + 15\,NaH_2PO_4 + \underbrace{CaHPO_4}_{\text{indissoluble}} + H_2O + \underbrace{CO_2}_{\text{volatile}}$$

According to equation (I) the hydrogen ion concentration does not change. According to equation (II) the hydrogen ion concentration decreases, as the anion of the reacting salt is volatile and is lost (p_H rises from 6.1 to 6.3). By equation (III) the hydrogen ion concentration will increase whilst p_H decreases from 6.1 to 5.9, owing to the circumstance that the kation of the reacting salt is precipitated in the form of a phosphate whilst the anion does not disappear at the same time. Finally, the hydrogen ion concentration decreases according to equation (IV) (whilst p_H increases from 6.1 to 6.2), because the volatile anion is lost; but it decreases less than by equation (II), because the kation of the reacting salt is at the same time precipitated in the form of a phosphate.

Supposing that the quantity of carbonate added to the mashing water is not so large as to prevent the total amount of carbonic acid from being set free by the phosphate mixture present, it will be easily seen that the action of the carbonates must necessarily be identical with that exerted by equivalent quantities of the corresponding free bases. A molecule of Na_2CO_3 must have the same effect as two molecules of NaOH *etc.* If we compare the equations (II) and (IV), it likewise becomes clear that the carbonates of alkalies must act more effectively than equivalent quantities of any other carbonates, since only the alkaline metals form water-soluble di- and tri-phosphates.

I have convinced myself of the correctness of the former view by undertaking mashing experiments in which $^1/_{200}$, $^1/_{100}$ and $^1/_{50}$ gr.-equivalents of Na_2CO_3 or $CaCO_3$ were added to 1000 cc. of mashing water. The results of these experiments were exactly the same as those of Experiments I and II, respectively, and are therefore not given in the tables.

The second assertion is confirmed by Experiments I, II and III (Table XXXIII). The only point in which the three bases had the same effect is the modification of the acidity, which is very nearly the same in all three experiments. On this point also, the equations (II) and (IV) give the requisite information: in either case we have to transfer 15 molecules of NaH_2PO_4 to 15 molecules of Na_2HPO_4. Consequently, in all three experiments we must find the same acidity, although we necessarily find different hydrogen ion concentrations according as a soluble or an insoluble disphosphate has been formed.

We have still to consider three columns in Table XXXIII, namely those relating to mineral constituents, ammonia separation or liberation, and peptid splitting.

With regard to mineral constituents we find that the amount extracted from the malt itself (the values calculated with salt correction) never increase, but nearly always decrease when salt solutions are used as mashing water. It is manifestly the acidity that is the determining factor, since the amount of mineral matters extracted from the malt is constantly found to decrease by reason of the action of the reacting salts, excepting those cases in which the acidity increases at the same time (Experiments IV, V and XIV); but not even in these cases does the amount of soluble mineral constituents increase; indeed, in experiments IV and V it even decreases a little. We shall not wait to inquire into the causes of this fact, but simply state it for the sake of completeness.

The liberation of ammonia is in no case influenced by the salts present in the mashing water. This is in perfect accord with the fact established in a foregoing chapter, that the liberation of ammonia takes place exclusively during germination.

The peptid splitting also remains nearly unaffected by the salts contained in the mashing water. The direction in which this action takes place manifestly depends upon the

change in hydrogen ion concentration, the experiments showing the peptid splitting to decrease or increase according as the hydrogen ion concentration decreases or increases. Only in experiment XIV the peptid splitting decreases inconsiderably or, rather, keeps constant, although the hydrogen ion concentration increases a little.

Our observations regarding the salt effect may be summed up as follows: —

The various transformation and decomposition processes of carbohydrates and proteïd substances are influenced during mashing in three different ways by the salts existing in the mashing water, namely: by the change of hydrogen ion concentration and acidity, and by the amount of salt. The greatest influence on the course of the transformations is exerted by the hydrogen ion concentration, and the least influence by the salt amount. If the hydrogen ion concentration, the acidity or the salt amount is augmented, the various transformation processes are promoted to a greater or less degree, whereas they are checked if the hydrogen ion concentration, acidity or salt amount is diminished. The ammonia liberation process, however, is not affected at all by these factors.

Where the maximum effect is situated for each of the above three factors, cannot of course be established with certainty. Our experimental results, however, prove that in the case of the carbohydrates the maximum effect will be exerted by a hydrogen ion concentration corresponding, approximately, with the exponent 5.5, and an acidity corresponding with 16.2 cc. of normal NaOH per 100 gr. of malt dry matter. With regard to proteïd transformation, on the contrary, the maximum must lie at a hydrogen ion concentration that is greater than 0.270×10^{-5} ($p_{H^{\cdot}} = 5.3$) and at an acidity higher than 18.8 cc. of normal NaOH per 100 gr. of malt dry matter. In practice, however, it will not do to exceed the maximum limits of carbohydrate transformation. Finally, my experiments appear to favour the belief that changes in the acidity tend to influence only the conversion of carbohydrates and

albumin, but not the other processes of proteïd transformation.

The question as to the part played by mineral matters in the processes of malting and brewing has for several years past been upon the carpet. Numerous experiments have been made in this direction, and widely different views have been taken by different searchers. The way has at length been paved for the solution of this question, namely by the investigations made of late years by O. Pankrath[1]), H. Seyffert[2]), E. Moufang[3]), F. Hayduck and K. Schücking[4]), M. Lisbonne[5]) and O. Miskovsky[6]), so that we have now to direct our attention chiefly to the hydrogen ion concentration. We are thus forced to enter the way opened up by S. P. L. Sørensen[7]), and more especially by his experiments with catalase, invertase and pepsin.

In order to obtain a view of the way in which the various proteïd transformation processes taking place in mashing are influenced by the hydrogen ion concentration, we may simply arrange the figures in Table XXXIII (Experiments II and IV) according to the hydrogen ion concentration. We thus arrive at the figures shown in Table XXXV (p. 328).

A graphic representation of this table, as given in Curve Table 4, shows that nearly all the proteïd transformation processes are greatly influenced by a modification of the hydrogen ion concentration answering to a change of the exponent from 6.2 to 6.0. Thus, the proteïd transformation processes are very sensitive to changes in the hydrogen ion concentration, especially if the latter is comprised between the values $0.357 \times 10^{\div 6}$ and $10^{\div 6}$.

With regard to the conditions prevailing in practice, I may mention here, before passing on to the processes taking place in the boiling wort, that even if we procure the most favourable conditions for a thorough-going demolition of proteïd matters in mashing, yet it is never to be expected that the albumin con-

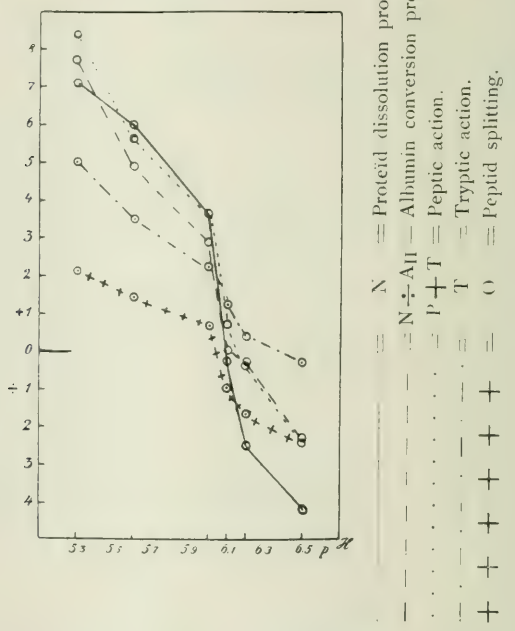
[1]) Zeitschr. f. d. ges. Brauw. **29**, 680, 691 (1906).
[2]) *Ibid.* **30**, 199, 214 (1907).
[3]) *Ibid.* **31**, 190, 197 (1908).
[4]) Wochenschr. f. Brauer. **25**, 241 (1908).
[5]) Compt. rend. Soc. Biol. **70**, 132 (1911).
[6]) Zeitschr. f. d. ges. Brauw. **34**, 49, 97 (1911).
[7]) Compt. rend. des travaux du Laborat. de Carlsb. **8**, 120 (1909).

TABLE XXXV.

Experiment	pH	The process fluctuates				
		N	N ÷ A_{II}	P + T	T	O
II c	6.5	÷ 4.2	÷ 2.3	÷ 2.3	÷ 0.3	÷ 2.4
II b	6.2	÷ 2.5	÷ 0.3	÷ 0.4	0.4	÷ 1.7
II a	6.1	÷ 0.3	0	0.7	1.2	÷ 1.0
IV a	6.0	3.6	2.9	3.6	2.2	0.7
IV b	5.6	6.0	4.9	5.6	3.5	1.4
IV c	5.3	7.1	7.7	8.4	5.0	2.1

All figures without signs are positive.

Curve Table 4.



version process can be accomplished in this way. That part of the mashing process which can do most in this respect is the preparatory mashing, provided it is effected at its optimum temperature (45°) and made to last a sufficient time (see p. 306—

308). This is in accord with the fact established before[1]), that the proteïd transformation taking place in germination can only be considered as normal and completed when the whole amount of albumin II has been converted into albumin I. If not, we cannot expect to get the error corrected in the course of mashing, even if we procure the most favourable conditions.

E. The Influence exerted on Proteïd Transformation by Wort Boiling.

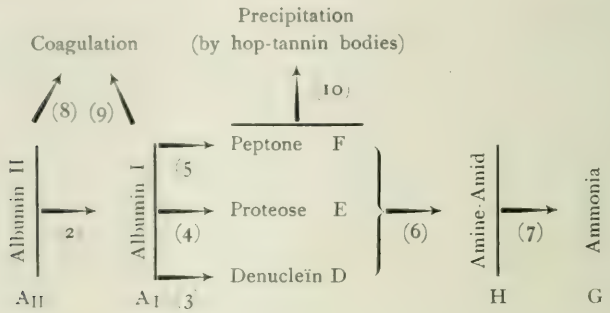
After filtering off the husks from unhopped malt wort prepared by the decoction method (at a final mashing temperature of 70°) and containing about 14 % of extract, it will very often become more or less turbid if cooled down to about 8°. This turbidity disappears if the wort is warmed to 30°—50°, but reappears on repeated cooling. In so far as this phenomenon is due to the presence of certain proteïd individuals, or perhaps one definite proteïd, these will always, when my analytical method of separation of the different proteïd groups is used, get precipitated together with albumin I (stannous chloride precipitation), even if, as is to be supposed, they belong to the group albumin II. If such a wort is boiled for a shorter or longer time, smaller or greater quantities of both albumin I and albumin II will be precipitated, and if boiling has been sufficiently prolonged (3 hours or so), the above-mentioned turbidity will fail to appear on cooling the filtered wort to 8°. Hence it appears that the turbidity brought about in the original unhopped wort must be due to the presence of a proteïd individual which in the course of boiling either coagulates out or is converted into another proteïd individual that is not apt to be secreted out at low temperatures.

Besides the transformation here referred to, the more complex proteïd individuals (the albumins) will of course also be more or less hydrolysed in boiling: they will be broken down to peptic decomposition products (denucleïn, proteose, peptone), which may in their turn get farther demolished to tryptic decomposition products (amine-amid and ammonia).

If the wort is boiled *without* addition of hops, it will be possible to observe the quantitative aspect of some of these

[1]) Compt. rend. des travaux du Laborat. de Carlsb. **8**, 280 (1910).

processes, it being certain that under these conditions no other proteid individuals than the albumins (I and II) are coagulated or precipitated. If, on the contrary, hops are added, it is a well known fact that the hop-tannin bodies will also precipitate greater or less quantities of peptic decomposition products. Thus, according to the decomposition scheme drawn up in the chapter relating to mashing, the state of affairs will be as follows: —



On analysis we arrive at the following results: —

Unboiled wort	1000 cc. of wort contains — gr. of nitrogen in the form of	After boiling of the wort
N	Total nitrogen	N'
A_{II}	Albumin II	A_{II}'
A_I	Albumin I	A_I'
D	Denucleïn	D'
E	Proteose	E'
F	Peptone	F'
P		= P'
H	Amine-Amid	H'
G	Ammonia	G'
T		= T'

If the wort is boiled without hops, we may thus calculate the numerical values of the undermentioned processes: —

Process:

$(8 + 9) = N' \div N$ = Coagulation.

$(3 + 4 + 5) = (P' + T') \div (P + T)$ = Peptic action.

$(6) = T' \div T$ = Tryptic action.

$(7) = G' \div G$ = Ammonia liberation.

The numerical value of the albumin conversion process (2)

cannot be calculated unless one of the two processes (8) and (9) is equal to 0. If so, we have: —

$$(2) = (A_{II} \div A_{II}') \div (8) = \text{Albumin conversion.}$$

If, on the contrary, the wort is boiled with hops, only the numerical values of the following processes can be calculated: —

Process:

$(8 + 9 + 10) = N' \div N = \text{Coagulation + Precipitation.}$

$(3 + 4 + 5) + (8 + 9) = (A_I + A_{II}) \div (A_I' + A_{II}') = \text{Peptic action + Coagulation.}$

$(3 + 4 + 5) \div (10) = (P' + T') \div (P + T) = \text{Peptic action} \div \text{Precipitation.}$

$(6) = T' \div T = \text{Tryptic action.}$

$(7) = G' \div G = \text{Ammonia liberation.}$

In these equations the coagulation and precipitation are judged as processes of negative values because either of them diminishes the nitrogen content of the wort. The peptic and tryptic decompositions referred to here are, of course, not of an enzymic nature, but simply hydrolytic processes (acid hydrolysis) which, exactly in the same way as enzymes, yield demolition products to be referred either to the peptic or the tryptic decomposition individuals.

It is further to be mentioned that, whenever after hop boiling we find a negative value for the difference $(P' + T') \div (P + T)$, the precipitation of the peptic decomposition products by the hop-tannin bodies must have had a higher numerical value than the peptic decomposition process itself, and conversely if that difference is found to be positive. In case $(P' + T) \div (P + T) = 0$, the precipitation and the peptic decomposition process must have had the same numerical value.

Finally it is to be observed that — as appears from the figures in Table XI, p. 258, — the hops themselves give off pretty considerable quantities of various substances to the wort boiled, so that the latter, if hops have been added, will always contain greater proportions of extract, ash, acid, total nitrogen and ammonia, than the original unboiled wort. We also find that the hydrogen ion concentration of the wort is always increased by the hops. Therefore, if we wish to know the effect produced by the hops upon the constituents of the wort itself,

we must necessarily introduce corrections for the specific effect of the hops. Unless otherwise stated, all the results brought together in the following tables are calculated with corrections for that effect, so that the figures directly show the manner in which, or rather the extent to which, the substances or groups of substances contained in the wort are affected by the hops.

On the basis of these details, we shall further on attempt to clear up the way in which and the extent to which the various transformation processes are influenced by each single factor coming into play in the wort boiled without or with hops.

(a) Duration of Boiling.

(See IX Series of Experiments, p. 259).

The experimental results, calculated with corrections for the specific effect of the hops, are shown in Table XXXVI, which also gives the requisite particulars regarding the procedure adopted.

The influence exerted by the duration of boiling upon the amount of extractive matters and soluble ash is so inconsiderable that it is covered by the experimental error. It is only after 18 hours' boiling that we are able to perceive a slight falling off in the amount of extractive matters, which is probably attributable to the circumstance that part of the albumins have been coagulated. Seeing, however, that the coagulation reaches its maximum after no more than 4 hours' boiling, we might expect at that very moment to meet with the greatest decrease in the amount of extractive matters. If this is not the case, the reason must undoubtedly be sought elsewhere, and particularly in the circumstance that in the course of boiling the group of carbohydrates also undergoes transformation, the most probable explanation being that di- and polysaccharides are partly hydrolysed and converted into monosaccharides, so that the proportion of extract will be augmented, thus: —

$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O = 2\,C_6H_{12}O_6.$$

Consequently these experiments only warrant the conclusion that the amount of extract is a little diminished in the first 4 hours' boiling — on account of the coagulation of albumins —, but that on further boiling it increases slightly — because the di- and polysaccharides are hydrolysed.

TABLE XXXVI.

The results calculated with corrections for the specific effect of the hops.

Standard wort No	Column marks	A	B	C	A_I	A_{II}	D	E	F	G	H	P	T	P+T	$A_I + A_{II}$	N	pH	Clarification of the wort
	300 cc. of standard wort boiled	1000 cc. of wort contains																
	with — gr. of hops	for — hours	gr. of extract in 1000 cc. of wort	gr. of ash	Acid ≙ cc. normal NaOH	gr. of nitrogen in the form of											without hop corrections	
						Albumin		peptic cleavage products = P			tryptic cleavage prod. = T		cleavage products					
						I	II	Denucleïn	Protease	Peptone	Ammonia	Amine-Amid	peptic	tryptic	proteolytic	Albumin I and II	total nitrogen		
I	Standard wort		163.2	2.46	18.0	0.140	0.112	0.112	0.007	0.126	0.039	0.696	0.245	0.735	0.980	0.252	1.232	—	extremely bad
	0	1/2	—	2.49	18.0	0.112	0.098	0.112	0.028	0.119	0.048	0.715	0.259	0.763	1.022	0.210	1.232	—	very bad
		1	163.2	—	18.0	0.112	0.084	0.119	0.035	0.119	0.770		0.273	0.770	1.043	0.196	1.239	—	bad
		2	—	—	18.0	0.091	0.112	0.098	0.014	0.119	—	—	0.231	—	—	0.203	—	—	good
		4	162.7	2.45	19.0	0.077	0.105	0.098	0.021	0.105	0.053	0.780	0.224	0.833	1.057	0.182	1.239	—	excellent
	2 (Saaz)	1/2	—	2.38	18.5	0.098	0 091	0.098	0.007	0.119	0.777		0.224	0.777	1.001	0.189	1.190	—	extremely bad
		1	163.1	—	18.5	0.084	0.098	0.091	0	0.126	0.784		0.217	0.784	1.001	0.182	1.183	—	very bad
		2	—	—	18.5	0.070	0.098	0.091	0.007	0.126	0.045	0.725	0.224	0.770	0.994	0.168	1.162	—	bad
		4	—	2.47	19.5	0.063	0.091	0.091	0.007	0.098	0.050	0.734	0.196	0.784	0.980	0.154	1.134	—	fairly satisfactory
II	Standard wort		148.9	2.16	16.5	0.119	0.077	0.119	0.056	0.077	0.039	0.717	0.252	0 756	1.008	0.196	1.204	6.0	bad
	0	1	148.7	2.16	16.5	0.077	0.182		0.140		0.048	0.729	—	0.777	—	—	1.176	5.8	pretty good
		4	147.8	2.12	17.5	0.056	0.077	0.105	0.056	0.049	0.053	0.752	0.210	0.805	1.015	0.133	1.148	5.6	excellent
		7	148.2	2.11	19.0	0.070	0.070	0.098	0.049	0.056	0.062	0.743	0.203	0.805	1.008	0.140	1.148	[1]	good
		18	147.4	2.09	23.5	0.084	0.063	0.091	0.049	0.035	0.067	0.759	0.175	0.826	1.001	0.147	1.148	[1]	bad
	2 (Saaz)	1	148.9	—	17.0	0.070	0.077	0.091	0.028	0.084	0.045	0.704	0.203	0.749	0.952	0.147	1.099	5.6	very bad
		4	149 0	2.20	18.0	0.063	0.077	0.077	0.028	0.077	0.050	0.699	0.182	0.749	0.931	0.140	1.071	5.4	bad
		7	149.0	2.20	19.5	0.063	0.049	0.098	0.049	0.056	0.053	0.724	0.203	0.777	0.980	0.112	1.092	[1]	pretty good
		18	148.1	2.12	23.5	0.070	0.049	0.091	0.042	0.049	0.064	0.734	0.182	0.798	0.980	0.119	1.099	[1]	bad
Analytical errors			0.2	0.06	0.4	0.012					0.007			0.007				0.1	

[1]) On account of the very intense coloration of the wort the determinations could not be effected after 7 and 18 hours' boiling.

The maximum for the coagulation of albumins occurs after about 7 hours' boiling. If we boil for 18 hours, we meet with a slight fall in the amount of extract, which is not due to a continued albumin coagulation, but probably rather to the circumstance that certain non-nitrogenous matters — perhaps pectin matters — are precipitated. As a significant evidence in support of this assumption I may point to the fact that the wort sample I did not give any albumin coagulation during boiling (without hops), although a pretty abundant secretion was produced, which could easily be filtered off. Since this deposit did not even contain a trace of nitrogen, it seems probable that it consisted of pectin matters or pectinous substances.

The acidity is not affected by a short boiling (2 hours); but if the boiling is prolonged, it is seen to increase. The increase is about the same whether hops have been added or not.

The hydrogen ion concentration increases as the boiling progresses. It appears that the hops do not affect this change beyond their own specific effect. The extent to which this action is produced by the hops cannot be fully ascertained because it was not possible to calculate the hop correction for the hydrogen ion exponent.

The faculty of clarification of the wort is at its optimum after 3—4 hours' boiling. When we boil with hops, the clarification is always inferior to what it is without hops; but even in the former case the optimum is found to be about 4 hours. We have not to inquire here into the causes why the faculty of clarification is diminished by the addition of hops.

The way in which proteïd matters are affected by the duration of boiling may be best elucidated by Table XXXVII, the figures of which are calculated on the basis of those in Table XXXVI, according to the rules given on pp. 330—331 in regard to the transformation occurring during the boiling of wort.

We shall first consider the state of things obtaining when the wort is boiled alone, without addition of hops.

The two experiments I A and II A may be taken to represent the extreme cases. The state of affairs most frequently met with is represented by the latter experiment. It is self-evident that the contrast is not due to the mashing process itself, since

the two worts concerned as well as all the other worts experimented upon in this connection were prepared in the same manner and under identical conditions. The reason is doubtless to be sought in the quality of the malt (germination).

TABLE XXXVII.

Wort sample No	Column marks: 300 cc. of standard wort boiled with — gr. of hops	for — hours	Standard wort showed: pH	Acidity	N'÷N: Coagulation	Coagulation + Precipitation	$A_{II} \div A_{II}'$: Albumin conversion + Coagulation of albumin II	$(P'+T') \div (P+T)$: Peptic action	Peptic action ÷ Precipitation	$\frac{(A_I+A_{II})}{(A_I'+A_{II}')}$: Peptic action + Coagulation	T'÷T: Tryptic action	G'÷G: Ammonia liberation	pH displaced in acid direction
			Numerical values of the transformation										
A	0	1/2	—	18.0	0	—	0.014	0.042	—	0.042	0.028	0.009	—
		1	—	—	0.07	—	0.028	0.063	—	0.056	0.035	—	—
		2	—	—	—	—	0	—	—	0.049	—	—	—
		4	—	—	0.07	—	0.007	0.077	—	0.070	0.098	0.014	—
B	2	1/2	—	—	—	÷0.042	0.021	—	0.021	0.063	0.042	—	—
		1	—	—	—	÷0.049	0.014	—	0.021	0.070	0.049	—	—
		2	—	—	—	÷0.070	0.014	—	0.014	0.084	0·035	0.006	—
		4	—	—	—	÷0.098	0.021	—	0	0.098	0.049	0.011	—
A	0	1	6.0	16.5	÷0.028	—	—	—	—	—	0.021	0.009	0.2
		4	—	—	÷0.056	—	0	0.007	—	0.063	0.049	0.014	0.4
		7	—	—	÷0.056	—	0.007	0	—	0.056	0.049	0.023	—
		18	—	—	÷0.056	—	0.014	÷0.007	—	0.049	0.070	0.028	—
B	2	1	—	—	—	÷0.105	0	—	÷0.056	0.049	÷0.007	0.006	0.4
		4	—	—	—	÷0.133	0	—	÷0.077	0.056	÷0.007	0.011	0.6
		7	—	—	—	÷0.112	0.028	—	÷0.028	0.084	0.021	0.014	—
		18	—	—	—	÷0.105	0.028	—	÷0·028	0.077	0.042	0.025	—
Analytical errors					0.007								0.1

All figures without signs are positive.

In Experiment I A (wort I boiled without hops) no coagulation takes place at all during boiling, whereas the albumin conversion process takes the desired course — albumin II being converted into albumin I — and increases with the time of boiling until the latter has been going on for one hour. If the boiling is continued beyond that time, the albumin conversion process becomes partly reciprocal, some of the albumin I formed being re-converted into albumin II. Our mashing experiments gave essentially the same result in regard to the albumin conversion process (see p. 310). I am inclined to believe, however, that the right comprehension of this very peculiar phenomenon

is afforded by the data given in the introduction to this chapter (p. 320). In fact, the proteid individual alluded to there, which is precipitated by cooling, does not disappear until the boiling has been continued for some time; but as soon as this transformation begins, it must, provided that nothing else happens, analytically manifest itself by a decrease in the quantity of albumin I and an increase in that of albumin II, since the proteïd individual in question is to be classed in the group albumin II. If therefore we find that the albumin conversion process begins to become reciprocal after, say, two hours' boiling, the reason must in reality be sought in the fact that the proteïd concerned loses its sensitiveness to low temperatures and is accordingly no more precipitated together with albumin I, but in its right form, *i. e.* as albumin II. The very fact that the albumin conversion process becomes reciprocal after two hours' boiling can therefore only be interpreted as a masked manifestation of a reaction the real course of which the analytical methods are unable to disclose with sufficient plainness.

Furthermore we find that both the peptic and tryptic decomposition increase as the boiling progresses, but that the relation between them is liable to undergo considerable variation. After $^1/_2$ and 1 hour's boiling the numerical value of the peptic decomposition is nearly twice as high as that of the tryptic; but if the boiling is continued beyond one hour, the case is entirely the reverse, the peptic cleavage increasing less than the tryptic. This obviously goes to prove that the consecutive order of the terms of the decomposition schemes drawn up in previous chapters is correct, the peptic cleavage being the first and the tryptic the second stage. Finally, the liberation of ammonia proves to increase slightly with the time of boiling, — as was to be expected.

In Experiment II A we meet with a quite different state of affairs. After 4 hours' boiling without hops the wort here gives a pretty considerable coagulation, about 4.7 % of the total nitrogen amount being coagulated; but the coagulation does not increase further even if the boiling be continued. Moreover, no peptic cleavage is observable at all even after 18 hours' boiling, the discrepancies corresponding to the analytical error. The tryptic cleavage, on the contrary, increases with the time of boiling, although less markedly than in Experiment I A. Finally,

the liberation of ammonia increases, just as in I A. The reason why the tryptic decomposition is less extensive in Experiment II A than in I A, evidently lies in the circumstance that the proteïd matter which has been coagulated out (albumin I) escapes any further influence from the boiling. The column ($A_{II} \div A_{II}'$) shows that the sum of the albumin conversion (conversion of albumin II into albumin I) and the coagulation of albumin II is = 0 after 4 hours', = 0.007 after 7 hours', and = 0.014 after 18 hours' boiling; but at the same time the amount of albumin I (see Table XXXVI) decreases in 1—4 hours' boiling and afterwards is seen to increase without the total coagulation decreasing: consequently we may infer that albumin II has no tendency to be coagulated during the boiling of the wort, whereas it is converted to a small extent into albumin I.

To sum up, the following transformations of proteïd matters are found to take place in wort boiled without addition of hops: —

A comparatively small amount of albumin II may be converted into albumin I. We cannot, however, expect in this way to obtain a wort devoid of albumin II, if in the malt from which it was prepared the albumin conversion process had not been brought to a close during germination. — Albumin II is not coagulated to any noticeable degree during the boiling of the wort.

A greater or less quantity of albumin I can be coagulated, and at the same time a smaller or greater proportion of the same proteïd is susceptible of being broken down to peptic decomposition products (denucleïn, proteose, peptone). The coagulation of albumin I reaches its maximum after 4 hours' boiling, and the coagulate is not re-dissolved on continued boiling.

Both the tryptic cleavage and the liberation of ammonia increase more or less as the boiling progresses.

The extent of coagulation is found to considerably influence both the peptic and tryptic demolition processes, whilst it does not appear to affect the ammonia separation process. When albumin I shows a great faculty of being coagulated, peptic cleavage may en-

tirely fail to appear, — and conversely if albumin I has only a slight faculty of coagulation.

The amount of peptic decomposition products almost always decreases, the tryptic cleavage being generally more intense during wort boiling than the peptic.

If now we direct our attention to the experiments I B and II B, comparing these with I A and II A respectively, it at once becomes conspicuous that the hops exercise a very noticeable influence upon the transformation of proteïd matters during the boiling of the wort. The inquiry then arises: In what manner are the different transformations affected by the hops and by the duration of boiling? Here again we meet with a very considerable difference between the worts I and II. In the former, the peptic cleavage is decidedly greater than the precipitation after $^1/_2$, 1 or 2 hours' boiling, whereas the results of these two processes are equal after 4 hours' boiling (see p. 331, l. 12 f. b.). In sample II, on the contrary, already after 1 hour's boiling the precipitation is found to be greater than the peptic action, and after 4 hours the same relation is met with in a still more marked degree. If, however, the boiling is prolonged beyond 4 hours (7 or 18 hours), the precipitation process begins to fall off or to become reciprocal, some of the proteïd matters precipitated entering again into solution, whereas the peptic action probably continues increasing a little; but nevertheless throughout the experiment the peptic action is continually found to be noticeably less than the precipitation [the column $(P' + T') \div (P + T)$ has a negative value]. The column $(N' \div N)$ also exhibits a marked difference between the two worts, sample I showing a noticeably less value of "coagulation + precipitation" than sample II. In either instance this sum increases with the duration of boiling until the latter has been going on for 4 hours. If the boiling is continued beyond this point, sample II B shows the sum to decrease again, in accordance with the above statement that some of the proteïds precipitated (probably especially the products of peptic action) are re-dissolved. During boiling from 4 to 7 hours the peptic cleavage products precipitated by the tannin of the hops are to all appearance dissolved in quantity corresponding with 0.021 gr. of nitrogen; but in the same time the proportion of the tryptic decomposition products in-

creases by precisely the same amount. If the boiling is prolonged from 7 to 18 hours, the quantity of peptic decomposition products precipitated which is again dissolved is very inconsiderable, whilst the proportion of tryptic decomposition products continually shows a marked increase, half part of which pertains to the ammonia liberation process. — The two worts also exhibit a great difference with regard to the behaviour of albumin II in hop boiling. In sample I the proportion of albumin II decreases noticeably when the wort is boiled $^1/_2$ hour with hops, a change which, whether it be due to a conversion into albumin I or to a coagulation, has already at this moment reached its maximum, whereas in wort II no variation at all occurs in the amount of albumin II during the first 4 hours. On the contrary, if the boiling is prolonged beyond 4 hours, the quantity of albumin II is seen to decrease, a fact which is in the main to be interpreted as a conversion into albumin I, inasmuch as the proportion of albumin I shows a slight increase although the peptic decomposition process increases somewhat at the same time. — As regards the ammonia liberation process, the checking influence exerted by the hops is quite insignificant, if not altogether *nil.*

In summing up these observations, we find that the hops, besides precipitating smaller or larger quantities of peptic cleavage products (denucleïn, proteose and peptone), tend to promote, to a greater or less extent, the coagulation, the peptic cleavage and perhaps the albumin conversion, whereas the tryptic decomposition is relatively weakened (owing to part of the peptic decomposition products being precipitated and thus escaping any further influence) and the ammonia liberation process not affected at all.

The maximum effect for the coagulation and precipitation processes is attained after 4 hours' boiling, which if prolonged will render at least the latter process reciprocal.

The quantitative action which the boiling of wort with hops exerts upon the proteïd matters in the wort depends very greatly upon the quality of the malt from which the wort was prepared, but of course also upon the mashing method used and several other factors.

The coagulation of albumin II, as well as the conversion of albumin II into albumin I, are quantitatively quite insignificant in wort boiling **with** or **without** hops. Consequently, we cannot expect, while boiling a wort, to get neutralised the error which it may exhibit in regard to albumin II, and which is due to the circumstance that it was prepared from a malt in which the proteïd transformation had not been completed in the course of germination.

(b) The Proportion of Hops.

(See X Series of Experiments, p. 259).

With regard to the way in which the chemical composition of the wort is affected by the hops, we cannot in any of our experiments expect to get a better chance of clearing it up than in the present experiment, in which equal quantities of the same wort are boiled for equally long periods of time with increasing proportions of the same hops. If from the analytical figures brought together in Table XIII we calculate the amounts of the various substance groups contained in 1000 cc. of wort, without introducing corrections for the specific effect of the hops, we shall arrive at numbers showing the direct action of the hops upon the chemical composition of the wort. See Table XXXVIII.

These figures prove that the addition of hops invariably results in an increase of the hydrogen ion concentration of the wort, as also of the amount of extractive matters, ash and acids contained in it. If these four series of figures were put up in a system of coordinates, the abscisses representing the quantity of hops added and the ordinates the figures recorded in the table, it would further be seen that, for all four values, the increase is very nearly proportional to the quantity of hops added. The faculty of clarification of the wort, on the contrary, decreases according as the quantity of hops is increased.

If we pass on to the nitrogenous matters, the state of affairs becomes rather more complicated.

The total amount of nitrogen in the wort (column N) decreases if it is boiled with very small quantities of hops. Immediately these are increased, the amount of total nitrogen in the wort again begins to rise. If 300 cc. of unhopped wort

TABLE XXXVIII.

The results calculated without corrections for the specific effect of the hops.

Column marks	A	B	C	A_I	A_{II}	D	E	F	G	H	P	T	P+T	A_I+A_{II}	N	pH	Clarification of wort
300 cc. of standard wort boiled for 3 hours with — gr. of hop (Saaz)	1000 cc. of wort contains																
	gr. of extract in 1000 cc. of wort	gr. of ash	Acid ∞ cc. normal NaOH	gr. of nitrogen in the form of													
				Albumin		peptic cleavage products = P			tryptic cleavage products = T		Cleavage products			Albumin I and II	total nitrogen		
				I	II	Denucleïn	Proteose	Peptone	Ammonia	Amine-Amid	peptic	tryptic	proteolytic				
Wort — unboiled	145.4	2.12	16.0	0.119	0.084	0.126	0.042	0.063	0.036	0.692	0.231	0.728	0.959	0.203	1.162	6.0	bad
0	145.6	2.12	17.0	0.070	0.063	0.112	0.049	0.063	0.048	0.715	0.224	0.763	0.987	0.133	1.120	5.8	excellent
0.5	145.7	2.25	17.5	0.056	0.070	0.105	0.049	0.056	0.048	0.722	0.210	0.770	0.980	0.126	1.106	5.8	good
2.0	147.4	2.47	19.5	0.056	0.077	0.091	0.021	0.077	0.053	0.745	0.189	0.798	0.987	0.133	1.120	5.6	bad
4.0	149.1	2.61	22.5	0.056	0.070	0.091	0.028	0.077	0.056	0.770	0.196	0.826	1.022	0.126	1.148	5.4	very bad
6.0	150.7	2.94	25.0	0.056	0.042	0.112	0.035	0.056	0.059	0.788	0.203	0.847	1.050	0.098	1.148	5.1	extremely bad
Analytical errors	0.2	0.06	0.4	0.012					0.007		0.007					0.1	

is boiled with 2 gr. of hops, which is very nearly the ratio used in practice, the wort boiled with hops will contain the same total nitrogen amount as that boiled without hops[1]). And we arrive at an analogous result if we consider the sum of the proteolytic decomposition products (column P + T). The amount of peptic decomposition products (P) decreases as the proportion of hops increases, the hop-tannin bodies precipitating part of the peptic decomposition products, until we have used 2 gr. of hops with 300 cc. of wort. If, on the contrary, the hop quantity be augmented beyond this point, the amount of peptic cleavage products again begins to increase, those once precipitated going partially again into solution, probably — in a certain measure at least — on account of the increased acidity. Since the hops themselves contain a pretty considerable quantity of nitrogen in the form of ammonia and amine-amid compounds, it is a matter of course that the amount of tryptic decomposition products (G + H = T) must increase proportionally to the added hop quantity, a conclusion which is confirmed by the figures. — As regards the albumins I and II (A_I and A_{II}), it will immediately be seen that only very small hop quantities are required to precipitate all that can be precipitated of albumin I, whereas albumin II cannot be precipitated at all without the addition of a rather considerable hop quantity. In the instance before us a hop addition three times as large as the normal quantity has proved unable to precipitate more than about half of the present quantity of albumin II. Thus, these experiments also go to prove the correctness of the above remarks concerning the behaviour of albumin II during the hop boiling, and they show how difficult it is to remove this proteïd from a wort.

By means of the experiment under consideration we have further to inquire into the manner in which the substances existing in the boiling wort are affected by the hops added. The necessary material for this inquiry is given in Table XXXIX, the figures of which have all been calculated with corrections for the specific effect of the hops (*i. e.*, for the matters given off by the hops themselves during the boiling process).

In contradistinction to the above statement (p. 340) we here

[1]) This agrees with the statements of H. T. Brown, *loc. cit.*

TABLE XXXIX.

The results calculated with corrections for the specific effect of the hops.

Column marks	A	B	C	A_I	A_{II}	D	E	F	G	H	P	T	P+T	A_I+A_{II}	N
300 cc. of standard wort boiled for 3 hours with — gr. of hops (Saaz)	1000 cc. of wort contains														
	gr. of extract in 1000 cc. of wort	gr. of ash	Acid to cc. of normal NaOH	gr. of nitrogen in the form of											
				Albumin		peptic cleavage products = P			tryptic cleavage products = T		Cleavage products			Albumin I and II	total nitrogen
				I	II	Denuc-lein	Proteose	Peptone	Ammo-nia	Amine-Amid	peptic	tryptic	proteo-lytic		
Wort — unboiled	145.4	2.12	16.0	0.119	0.084	0.126	0.042	0.063	0.036	0.692	0.231	0.728	0.959	0.203	1.162
0	145.6	2.12	17.0	0.070	0.063	0.112	0.049	0.063	0.048	0.715	0.224	0.763	0.987	0.133	1.120
0.5	145.0	2.18	17.0	0.056	0.070	0.105	0.049	0.056	0.048	0.708	0.210	0.756	0.966	0.126	1.092
2.0	145.1	2.19	17.0	0.056	0.084	0.084	0.014	0.077	0.048	0.701	0.175	0.749	0.924	0.140	1.064
4.0	144.3	2.04	17.5	0.056	0.084	0.077	0.014	0.077	0.048	0.680	0.168	0.728	0.896	0.140	1.036
6.0	144.1	2.06	17.0	0.056	0.063	0.091	0.014	0.056	0.048	0.673	0.161	0.721	0.882	0.119	1.001
Analytical errors	0.2	0.06	0.4	0.012					0.007		0.007				

find that the extract amount of the wort decreases more and more as increasing quantities of hops are added. On confronting these contradictory results we arrive at the main conclusion that the wort gives off extractive matters to the hops, just as the hops give off such matter to the wort, but that the former process always has a slightly higher numerical value than the latter.

TABLE XXXX.

Column marks	N' ÷ N		$A_{II} \div A_{II}'$	$\frac{(P'+T')}{(P+T)}$		$\frac{(A_I+A_{II})}{(A_I'+A_{II}')}$	T' ÷ T	G' ÷ G	pH changed in acid direction
	Numerical values of the process								
300 cc. of standard wort boiled for 3 hours with — gr. of hops (Saaz)	Coagulation	Coagulation + Precipitation	Albumin conversion + Coagulation of albumin II	Peptic cleavage	Peptic cleavage ÷ Precipitation	Peptic cleavage + Coagulation	Tryptic cleavage	Ammonia liberation	
0	÷0.042	÷0.042	0.021	0.028	0.028	0.070	0.035	0.012	0.2
0.5	—	÷0.070	0.014	—	0.007	0.077	0.028	0.012	0.2
2.0	—	÷0.098	0	—	÷0.035	0.063	0.021	0.012	0.4
4.0	—	÷0.126	0	—	÷0.063	0.063	0	0.012	0.6
6.0	—	÷0.161	0.021	—	÷0.077	0.084	÷0.007	0.012	0.9
Analytical errors	0.007								0.1

All figures without signs are positive.

Since the quantitative influence of the hop amount upon the mineral constituents and acidity of the original wort may be regarded as = 0, the deviations coïnciding very nearly with the analytical error, it follows that the hops do not affect the mineral matters or acidity of the wort beyond the sum of ash and acid (or acid compounds) given off by the hops to the boiling wort.

If we are to inquire into the way in which and the extent to which the proteïd matters existing in the wort are affected by the hops, the fullest information may be gathered from the figures brought together in Table XXXX.

This table confirms the correctness of the previous results relating to the transformation, both when the wort is boiled without hops (see the uppermost series of figures) and when it is boiled with hops (see the four lowest series). As regards the

question as to the effect exerted by the hops upon the nitrogenous organic matters present in the wort, a reference to the results given on p. 339 may therefore suffice, if supplemented by the additional statement that the greater the proportion of hops added to the wort, the more will the various transformation processes be influenced in the directions concerned. In other words: The larger the amount of hops added to the boiling wort, the more will the coagulation, precipitation (of peptic cleavage products) and peptic splitting be promoted, but at the same time the albumin conversion and tryptic cleavage will be impaired in proportion. The ammonia liberation process, on the contrary, remains entirely unaffected by the hops.

(c) The Temperature or Pressure during Boiling.

(See XI Series of Experiments, p. 259).

Before considering in greater detail our experimental results, it is to be observed that these were obtained with two different worts. A comparison of one of the two experiments with the other is therefore out of the question. The results, as set forth in Table XXXXI, are calculated with corrections for the specific effect of the hops (except in the case of the hydrogen ion exponent).

The extract amount of the wort may possibly decrease slightly as the boiling temperature is raised. This applies more especially to worts boiled without hops. If hops have been added, the extract amount decreases a little indeed, as the temperature rises to 101°; but beyond this point, it begins to increase. These fluctuations, however, are but small, but they manifestly coïncide with those to which the total nitrogen content (N) is subjected. It therefore appears to be the most plausible conclusion that the whole change in the amount of extract is contingent upon the changes occurring in the coagulation and precipitation processes. If these increase, the extract amount decreases, and conversely.

Since the fluctuations in the figures relating to mineral constituents are so small as to coïncide with the experimental error, it may safely be concluded that the temperature at which the boiling is effected does not play any part with regard to the ash content of the wort.

TABLE XXXXI.

The results calculated with corrections for the specific effect of the hops.

Wort sample No	Column marks: 300 cc. of standard wort boiled for 3 hours — with — gr. of hop	at a pressure ≈ about m.m. Hg	temperature of the liquid	A: gr. of extract in 1000 cc. of wort	B: gr. of ash	C: Acid ≈ cc. of normal NaOH	AI	AII	D	E	F	G	H	P	T	P+T	AI+AII	N	pH without hop correction	Clarification of wort
				1000 cc. of wort contains			gr. of nitrogen in the form of													
							Albumin		peptic cleavage products = P			tryptic cleavage products = T		Cleavage products			Albumin I and II	total nitrogen		
							I	II	Denucleïn	Proteose	Peptone	Ammonia	Amine-Amid	peptic	tryptic	proteolytie				
I	o	Standard wort, unboiled		144.0	2.10	17.5	0.119	0.119	0.091	0.014	0.105	0.042	0.728	0.210	0.770	0.980	0.238	1.218	5.8	bad
		230	78°	144.0	2.07	17.5	0.098	0.112	0.091	0.021	0.091	0.048	0.743	0.203	0.791	0.994	0.210	1.204	5.8	good
		760	101°	143.5	2.03	18.0	0.070	0.098	0.084	0.028	0.091	0.053	0.752	0.203	0.805	1.008	0.168	1.176	5.6	excellent
		985	109°	143.4	2.10	18.5	0.063	0.105	0.077	0.021	0.084	0.056	0.742	0.182	0.798	0.980	0.168	1.148	5.4	excellent
II	2 Saaz first class	Standard wort, unboiled		150.1	2.07	18.0	0.119	0.112	0.098	0.021	0.126	0.042	0.700	0.245	0.742	0.987	0.231	1.218	5.9	very bad
		250	76°	150.0	2.12	18.5	0.084	0.084	0.105	0.021	0.112	0.042	0.749	0.238	0.791	1.029	0.168	1.197	5.7	excellent
		760	101°	149.4	2.09	19.5	0.056	0.063	0.098	0.042	0.084	0.050	0.727	0.224	0.777	1.001	0.119	1.120	5.6	very good
		970	109°	150.0	2.14	20.0	0.063	0.077	0.084	0.035	0.091	0.056	0.756	0.210	0.812	1.022	0.140	1.162	5.5	pretty good
Analytic errors				0.2	0.06	0.4	0.012					0.007		0.007					0.1	

The acidity increases as the boiling temperature rises, whether hops have been added or not; accordingly, the hydrogen ion concentration also increases.

It may be mentioned here that when the wort is boiled with hops, the faculty of clarification diminishes as the temperature rises; but the colour of the wort is intensified.

It is especially worthy of remark that the change undergone by the extract amount of the boiling wort depends, in the main at least, on the way in which the coagulation and precipitation processes go off.

TABLE XXXXII.

Column marks			N' ÷ N		$A_{II} \div A_{II}'$	$\frac{(P' + T')}{(P + T)}$		$\frac{(A_I + A_{II})}{(A_I' + A_{II}')}$	T' ÷ T	G' ÷ G	pH changed in acid direction (without hop correction)
300 cc. of standard wort boiled for 3 hours			Numerical values of the process								
with — gr. of hop	at a pressure ∾ about m.m. Hg	temperature in the liquid	Coagulation	Coagulation + Precipitation	Albumin conversion + Coagulation of albumin II	Peptic cleavage	Peptic cleavage ÷ Precipitation	Peptic cleavage + Coagulation	Tryptic cleavage	Ammonia liberation	
0	230	78°	÷0.014	—	0.007	0.014	—	0.028	0.021	0.006	0
	760	101°	÷0.042	—	0.021	0.028	—	0.070	0.035	0.011	0.2
	985	109°	÷0.070	—	0.014	0	—	0.070	0.028	0.014	0.4
2 (Saaz)	250	76°	—	÷0.021	0.028	—	0.042	0.063	0.049	0	0.2
	760	101°	—	÷0.098	0.049	—	0.014	0.112	0.035	0.008	0.3
	970	109°	—	÷0.056	0.035	—	0.035	0.091	0.070	0.014	0.4
Analytical errors			0.007								0.1

All figures without signs are positive.

The influence exerted by the temperature or pressure on the proteid matters in the boiling wort is clearly shown in Table XXXXII.

In the experiment in which the wort was boiled without hops (I) the coagulation is seen to increase with the boiling temperature, and the same is true in regard to all the other transformation processes, at any rate till we have reached the temperature 101° (= 1 atmosphere). When the pressure is increased beyond 1 atmosphere, some of the processes are apparently weakened, since the values found for $(A_{II} \div A_{II}')$, $[(P' + T')$

$\div (P - T)$ and $(T \div T$ after 3 hours' boiling at 109° are less than after 3 hours' boiling at 101°. Since the bynedestin, which is precipitated in the form of albumin II, begins to be coagulated at 85°, whilst edestin, which is likewise precipitated in the form of albumin II, is only coagulated at temperatures above 90°[1], we may safely conclude that at a boiling temperature of 78° there does not occur any coagulation of albumin II at all. The fact that after 3 hours' boiling at 78° the amount of albumin II has nevertheless been diminished — very inconsiderably indeed, namely only by 0.007 — must be attributed to a conversion of albumin II into albumin I. If the wort is boiled for 3 hours at 101°, the amount of albumin II is seen to further decrease by 0.014, owing probably to a coagulation of albumin II. Finally, if the wort is boiled 3 hours at 109°, the quantity of albumin II decreases by a total value of only 0.014, which corresponds exactly with the value found above for the coagulation of albumin II. In other words, the albumin conversion process is altogether repressed when the wort is boiled at a pressure higher than 1 atmosphere, whereas the coagulation of albumin II does not occur at all when the wort is boiled at so low a pressure that the temperature does not attain 100°. The coagulation of albumin II does not increase even though the pressure be somewhat augmented, whilst it is quite possible that the coagulate may again be partially dissolved if the pressure is considerably augmented[2]. The peptic cleavage increases by the value 0.014 when the wort is boiled at 78° for 3 hours, and by 0.028 when it is boiled at 101°. But if the wort is boiled at 109° for 3 hours, the peptic cleavage process does not increase at all. This result may seem to be rather contradictory; but on closer inspection the figures will show in what way this apparent contradiction arises. According to what we have previously shown in regard to albumin II, there does not occur any albumin conversion at all when wort is boiled at 109°, and an inspection of the column $(A_I + A_{II}) \div (A_I' + A_{II}')$ will show that the sum of the peptic cleavage and the coagulation is the same whether the temperature be 101° or 109°; in other words, the sum of the two albumins is the same in either instance. This can only occur

---

[1]) Th. B. Osborne, *loc. cit.*

[2]) Zeitschr. f. anal. Ch., **39**, 561 (1900).

if there cannot occur any peptic cleavage process at all because the proteïd individual to be attacked (albumin I) is precipitated at once in an insoluble form (coagulation) and in this way withdrawn from all further influence, or else if the said process results in such decomposition products (perhaps certain proteoses) as can be coagulated at least partially at temperatures above 101°. Which of these two explanations is true, cannot be decided; but the facts appear to be rather in favour of the former. It is by no means to be wondered at that the tryptic decomposition process exhibits a — very slightly — lower numerical value after 3 hours' boiling at 109° as compared with 3 hours' boiling at 101°; for a certain amount of the substances which use to be broken down have been coagulated and have thus escaped any further action. Finally, it will be noticed that the ammonia liberation increases a little with the boiling temperature.

Thus, a pressure exceeding one atmosphere influences the proteïd transformations in boiling wort in a similar way to an augmented addition of hops (see the previous chapter).

The above considerations lead to the following main results: —

The coagulation of the albumins (I and II) increases with the boiling temperature or the pressure under which the boiling operation takes place. In the case of albumin II, however, the maximum effect is produced by a pressure of one atmosphere. At very high pressures greater or smaller quantities of the albumins once coagulated are without doubt re-dissolved.

The albumin conversion (transformation of albumin II into albumin I) occurs only when the wort is boiled at a temperature not exceeding 101°, this transformation being at its maximum perhaps already at 78° or there about. It entirely fails to appear when the boiling takes place at 109°, that is, under a pressure higher than one atmosphere.

The peptic and tryptic cleavage processes increase with the boiling temperature. The maximum, however, is at 101°: if the temperature is raised above 101°, either of these two processes decreases, the albumins which have been coagulated escaping any further action; this applies more particularly to the peptic cleavage.

The liberation of ammonia increases a little with the boiling temperature (pressure).

If, finally, we consider the experiment in which the wort was boiled with hops (II), we shall find a corroboration of the above observations, at least as regards the ammonia liberation process and the sum of albumin conversion and coagulation of albumin II. As for the other columns, we arrive at rather different results as soon as we reach 109°. If, however, we bear in mind the fact previously established, that greater or smaller quantities of peptic cleavage products are precipitated (not coagulated) by the hops, the column (N' ÷ N) will give the requisite information. Coagulation + precipitation increases as the temperature rises to 101°; but if it is raised to 109°, this sum is again diminished very noticeably, apparently a consequence of the circumstance that the peptic cleavage products once precipitated begin to again enter into solution, which in its turn will result in an increase of both the value "peptic cleavage ÷ precipitation" as well as "tryptic cleavage", the increase in the latter case being almost proportional to the precipitation. As regards the fact that the value "peptic cleavage + coagulation" becomes a little less at the same time, I am unable to account for it, since it is impossible to ascertain to what extent the two components or factors in the column ($A_{II} \div A_{II}'$) — albumin conversion and coagulation of albumin II — are changed in proportion to each other during hop boiling. One reason of this is without doubt to be sought in the circumstance that the hop-tannin bodies are able to precipitate albumin II at temperatures lower than that of coagulation. — Other experiments, the results of which are not embodied in this memoir, have not led to a clearer understanding of the question, but have only shown that different worts are apt to give somewhat different quantitative results. This part of the question, however, has been touched upon in a previous chapter, and can by no means be said to be surprising. —

Thus, the main result is that the effect exerted by the hops upon the proteïd matters existing in the wort is notably influenced by the temperature, and consequently also the pressure at which it is boiled. The effect of the hops is greatest at a pressure of one atmosphere, at any rate as far as the coagulation, preci-

pitation and peptic cleavage are concerned. Only the tryptic cleavage and ammonia liberation continue increasing when the temperature exceeds 101°.

(d) The Concentration of the Wort.

(See XII. Series of Experiments, p. 260).

Table XXXXIII contains the values of the different groups of substances, calculated in proportion to 100 gr. of extract, for the reason explained in the description of the experiment. It is to be observed, however, that in the case where the wort has been boiled with hops, the ratio of hops to extract is always the same, *viz.* 2 gr. of hops to 300 cc. of the same standard wort. The figures are accordingly direct comparable, except those representing the amount of extract.

It will be seen at once that neither the quantity of soluble mineral matters nor the acidity is influenced by the concentration of the wort. There is a slight indication that the acidity of the boiling wort decreases and increases with the concentration of the latter; but the deviations coïncide very nearly with the analytical error. The clarifying faculty of the wort is influenced somewhat by boiling with hops, since it apparently increases when the concentration of the liquid decreases.

As regards the influence exerted by the concentration of the wort upon the transformation of proteïd matters during boiling, an inspection of Table XXXXIV, p. 353, will be useful.

First, with regard to the wort boiled without hops, it appears that the coagulation, tryptic cleavage and ammonia liberation are but very slightly, if at all, affected by the concentration of the wort. At an extract content of about 10% the coagulation appears to reach a maximum, and the tryptic cleavage a minimum; but, as mentioned before, the deviations are very slight. The peptic cleavage, on the contrary, is seen to increase, when the concentration decreases, whilst the amount of albumin II diminishes with the concentration. Whether this latter change is due to the albumin conversion, or perhaps the coagulation of albumin II, increasing when the concentration decreases, cannot, however, be inferred from the column ($A_{II} \div A_{II}'$) alone. But Table XXXXIII shows all three worts to contain exactly the

TABLE XXXXIII.

The results calculated with corrections for the specific effect of the hops.

Column marks		A	B	C	A_I	A_{II}	D	E	F	G	H	P	T	P+T	$\frac{A_I + A_{II}}{2}$	N	
300 cc. of standard wort boiled for 3 hours			100 gr. of extract contains														
					gr. of nitrogen in the form of												
					Albumin		peptic cleavage products = P			tryptic cleavage prod. = T		Cleavage products					
mixed up with — cc. of distilled water	with — gr. of hops	% of extract (Ball.) before boiling of the wort	gr. of ash	Acid ∞ cc. of normal NaOH	I	II	Denucleïn	Protease	Peptone	Ammonia	Amine-Amid	peptic	tryptic	proteolytic	Albumin I and II	total nitrogen	Clarification of wort
Standard wort, unboiled		15.11	1.47	11.3	0.074	0.066	0.083	0.026	0.062	0.025	0.443	0.171	0.468	0.639	0.140	0.779	bad
0	0	15.11	1.48	11.9	0.044	0.066	0.061	0.017	0.048	0.525		0.126	0.525	0.651	0.110	0.761	excellent
150	0	10.24	1.50	11.3	0.044	0.052	0.070	0.027	0.052	0.033	0.475	0.149	0.508	0.657	0.096	0.753	excellent
300	0	7.76	1.41	11.3	0.044	0.044	0.070	0.035	0.043	0.032	0.493	0.148	0.525	0.673	0.088	0.761	excellent
0	2 Saaz	15.11	1.45	12.2	0.035	0.017	0.101	0.057	0.009	0.030	0.477	0.167	0.507	0.674	0.052	0.726	good
150	2 Saaz	10.24	1.45	11.6	0.035	0.031	0.087	0.035	0.026	0.032	0.472	0.148	0.504	0.652	0.066	0.718	very good
300	2 Saaz	7.76	1.47	11.3	0.035	0.057	0.061	0.013	0.057	0.032	0.471	0.131	0.503	0.634	0.092	0.726	excellent
Analytical errors			0.09	0.6	0.015					0.008		0.008					

TABLE XXXXIV.

Column marks		N' ÷ N	$A_{II} \div A_{II}'$	(P' + T') ÷ (P + T)	$\frac{(A_I + A_{II})}{(A_I' + A_{II}')}$	T' ÷ T	G' ÷ G
300 cc. of standard wort boiled for 3 hours		Numerical value of the process					
mixed up with — cc. of distilled water	with — gr. of hops	Coagulation	Coagulation + Precipitation	Albumin conversion + Coagulation of albumin II	Peptic cleavage	Peptic cleavage + Precipitation	Peptic cleavage + Coagulation	Tryptic cleavage	Ammonia liberation
0	0	÷0.018	—	0	0.012	—	0.030	0.057	—
150	0	÷0.026	—	0.014	0.018	—	0.044	0.040	0.008
300	0	÷0.018	—	0.022	0.034	—	0.052	0.057	0.007
0	2 (Saaz)	—	÷0.053	0.049	—	0.035	0.088	0.039	0.005
150	2 (Saaz)	—	÷0.061	0.025	—	0.013	0.074	0.036	0.007
300	2 (Saaz)	—	÷0.053	0.009	—	÷0.005	0.048	0.035	0.007
Analytical errors		0.008							

All figures without signs are positive.

same quantity of albumin I, and since the peptic cleavage has been seen to increase when the wort concentration decreases, whereas the coagulation remains constant, it is evident from the decomposition scheme that the amount of albumin II converted into albumin I must be constantly equal to that of albumin I broken down into peptic cleavage products. From these data the numerical value of each transformation in this experiment may be calculated, and we arrive at the following figures: —

Water added, in cc.	Albumin conversion	Coagulation of Albumin		Peptic action	Change in the amount of Albumin I	
		II	I		Calculated	Found
0	0	0	0.018	0.012	0.030	0.030
150	0.006	0.008	0.018	0.018	0.030	0.030
300	0.022	0	0.018	0.034	0.030	0.030

Thus, the albumin conversion increases when the concentration of the boiling wort decreases, whereas the coagulation of albumin II remains unaffected by

this factor (see the analytical error). This result tallies with those of our previous boiling experiments in so far as it confirms the correctness of the observations made in the latter, according to which the coagulation of albumin II hardly plays any perceptible part in the boiling of wort without hops.

As regards the wort boiled with hops, the results arrived at are rather obscure, as is always the case when the effect of hops upon the proteid matters of the wort is inquired into, because we are unable to determine the quantity of peptic cleavage products or albumin II precipitated by the hop-tannin bodies. The results obtained, however, are in perfect keeping with those previously arrived at, it being plainly seen that the hops, besides precipitating noticeable quantities of peptic cleavage products, tend to promote the coagulation, peptic cleavage and perhaps albumin conversion, whilst the tryptic cleavage is rather weakened; it is true that a perceptible tryptic cleavage takes place, but its numerical value is less when the wort is boiled with than when it is boiled without hops. The ammonia liberation is not affected. The question therefore arises: Does the wort concentration exert any influence on these different actions?

That the tryptic cleavage and the ammonia liberation are unaffected by the concentration of the wort, is evident from the two columns relating to these processes in Table XXXXIV. It will also be seen that the sum "coagulation + precipitation" is not affected either, whereas the three columns "Albumin conversion ÷ coagulation of albumin II", "Peptic cleavage ÷ precipitation" and "Peptic cleavage + coagulation" decrease in numerical value as the wort concentration decreases. Finally, it is shown by Table XXXXIII that the amount of albumin I is the same in all three worts, namely 0.035, whence it follows that we must constantly have the numerical value of: coagulation of albumin I + peptic cleavage ÷ albumin conversion = 0.039. These are the facts established; but they are too complex to give us a clear insight into the real state of the case. Only this much can be said with certainty: The peptic cleavage decreases in proportion to the precipitation of the peptic cleavage products by the hop-tannin bodies according as the wort concentration is reduced; indeed we find the numerical value of the column [(P' + T') ÷ (P + T)] to become less and less, — at the wort concentration

7.76 % of extract, the peptic cleavage is 0.005 lower than the precipitation, and so forth.

The only results which can be deduced with certainty from this experiment are therefore the following:

The wort concentration does not play any part with regard to the amount of nitrogen removed from the wort (by coagulation and precipitation) during hop boiling. On the other hand, nothing definite can be said in regard to the question as to whether the relation between coagulation and precipitation is changed with the wort concentration.

The amount of albumin II removed from the wort during hop boiling decreases with the wort concentration. Since the case is entirely the reverse when no hops have been added, it is to be supposed that both the coagulation of albumin II and the conversion of albumin II into albumin I decrease during hop boiling when the wort concentration decreases.

In the course of the hop boiling the numerical value of the precipitation of peptic cleavage products increases in proportion to the value of peptic cleavage according as the wort concentration decreases.

Neither the tryptic cleavage nor the ammonia liberation is affected by the wort concentration during hop boiling

(e) The Importance of Oxygen in Wort Boiling.

(See XIII. Series of Experiments, p. 263).

The experiment which we now proceed to describe was undertaken exclusively with the view of gaining information about the question as to whether the oxygen of the air takes an active part or not in the transformations occurring in proteïd matters during wort and hop boiling. The analytical results, calculated with corrections for the specific effect of the hops, are set forth in Table XXXXV, p. 356, which also gives full particulars regarding the arrangement of the experiment.

The amount of ash diminishes a little when the oxygen tension increases, a fact which is probably due to a trace of ferro-salt being converted into a ferric-salt, which is precipitated. The acidity, on the contrary, is not affected, and the same

TABLE XXXXV.

The results calculated with corrections for the specific action of hops.

Column marks		A	B	C	A_I	A_{II}	D	E	F	G	H	P	T	P+T	$A_I + A_{II}$	N	pH	
300 cm³ of standard wort boiled for 3 hours			1000 cc. of wort contains															
					gr. of nitrogen in the form of													
					Albumin		peptic cleavage products = P			tryptic cleavage products = T		cleavage products			Albumin I and II	total nitrogen		
with — gr. of hops	in an atmosphere of	gr. of extract in 1000 cc. of wort	gr. of ash	Acid ∞ cc. of normal NaOH	I	II	Denucleïn	Proteose	Peptone	Ammonia	Amine-Amid	peptic	tryptic	proteolytic			without correction for the hop	Clarification of the wort
Standard wort, unboiled		147.9	2.19	18.5	0.126	0.105	0.098	0.014	0.140	0.045	0.732	0.252	0.777	1.029	0.231	1.260	6.0	very bad
0	Hydrogen	—	2.15	19.0	0.077	0.133	0.056	0	0.126	0.056	0.756	0.182	0.812	0.994	0.210	1.204	5.9	pretty good
	Air	—	2.11	19.0	0.070	0.119	0.084	0.014	0.112	0.056	0.749	0.210	0.805	1.015	0.189	1.204	5.9	excellent
	Oxygen	—	1.96	19.5	0.070	0.126	0.070	0.007	0.126	0.056	0.721	0.203	0.777	0.980	0.196	1.176	5.9	excellent
2 (Saaz)	Hydrogen	—	—	20.0	0.056	0.091	0.084	0.014	0.112	0.053	0.738	0.210	0.791	1.001	0.147	1.148	5.8	bad
	Air	—	—	20.5	0.056	0.098	0.077	0.014	0.119	0.053	0.731	0.210	0.784	0.994	0.154	1.148	5.8	pretty good
	Oxygen	—	—	20.0	0.056	0.105	0.077	0	0.119	0.053	0.710	0.196	0.763	0.959	0.161	1.120	5.8	pretty good
Analytical errors		0.2	0.06	0.4	0.012					0.007		0.007					0.1	

applies to the hydrogen ion concentration. On the other hand, it is indisputable that the faculty of clarification of the wort is somewhat improved when the boiling is effected in a gas mixture containing oxygen, as compared with one devoid of oxygen. The oxygen tension in the atmospheric air is, however, apparently sufficient to bring about the optimum effect.

With respect to the behaviour of the proteïd matters, an inspection of Table XXXXVI will give some information.

TABLE XXXXVI.

Column marks		$N' \div N$		$A_{II} \div A_{II}'$	$(P'+T') \div (P+T)$	$\frac{(A_I + A_{II})}{(A_I' + A_{II}')}$		$T' \div T$	$G' \div G$	pH·
300 cc. of standard wort boiled for 3 hours		Numerical values of the process								changed in acid direction
with — gr. of hops	in an atmosphere of	Coagulation	Coagulation + Precipitation	Albumin conversion + Coagulation of albumin II	Peptic action	Peptic action ÷ Precipitation	Peptic action + Coagulation	Tryptic action	Ammonia liberation	
0	Hydrogen	÷0.056	—	÷0.028	÷0.035	—	0.021	0.035	0.011	0.1
	Air	÷0.056	—	÷0.014	÷0.014	—	0.042	0.028	0.011	0.1
	Oxygen	÷0.084	—	÷0.021	÷0.049	—	0.035	0	0.011	0.1
2 (Saaz)	Hydrogen	—	÷0.112	0.014	—	÷0.028	0.084	0.014	0.008	0.2
	Air	—	÷0.112	0.007	—	÷0.035	0.077	0.007	0.008	0.2
	Oxygen	—	÷0.140	0	—	÷0.070	0.070	÷0.014	0.008	0.2
Analytical errors		0.007								0.1

All figures without signs are positive.

The first thing to be noticed is the very peculiar fact exhibited by the negative sign of the column ($A_{II} \div A_{II}'$), *viz.* that the amount of albumin II increases when the standard wort is boiled without hops. This wort is, amongst all those employed in my experiments, the only one which has given this result, apparently owing to the circumstance that it was particularly rich in the proteïd individual described in the Introduction (p. 329) as very susceptible of cold (albumin II). In fact, the wort became particularly turbid at lower temperatures, but this turbidity disappeared almost entirely on heating to 40°. If, therefore, in the present experiment the quantity of albumin II increases during

the boiling process, this may be accounted for in one of two ways, namely either by supposing the albumin conversion process to become reciprocal (as a matter of fact, it sometimes does) so that a certain proportion of albumin I is converted into albumin II, — or by assuming that the proteïd individual sensitive to cold loses this property and is consequently, at the end of the boiling process, precipitated in the form of albumin II, whereas, so long as it preserves its sensitiveness to low temperatures existing in an insoluble form at room temperature), it is precipitated together with albumin I, despite of the fact that it belongs to the group "albumin II". Which of these two explanations is correct, cannot be decided; yet the peculiarities of the wort under consideration seem to favour the latter explanation.

There is still another point in which this wort shows a quite abnormal behaviour during boiling. I allude to the fact that in all three experiments the peptic cleavage is found to be decreasing (the numerical values having negative signs). This might be supposed to mean that certain quantities of the peptic decomposition products existing in the standard wort are regenerated or condensed to albumin I, or perhaps even altogether reconverted to albumin II (?). Indeed, this is the only way in which I can account for the fact for the present, feeling as I do that there are strong, and perhaps even inhibitive, objections against this view. — There is also this remarkable feature about the irregularity in question, that the peculiarities referred to were observed more particularly in those cases where the wort was boiled in an atmosphere consisting of either pure hydrogen or pure oxygen. In the case where the boiling took place in atmospheric air the results obtained point in the same direction; but their numerical values amount only to twice as much as the analytical error and can hardly be of any decisive importance. Amongst the numerous worts I have examined, this is the only one in which I have found the peptic cleavage process to become reciprocal during boiling without hops. In my diary I find no statement to the effect that in the course of the experiment itself any other irregularity beyond the sensitiveness of the wort to low temperatures was observable. Therefore, to the best of my belief, an experimental error is out of the question.

Notwithstanding these peculiarities in the standard wort itself, our experimental results may safely be utilised to settle the

question as to whether the proteïd transformations taking place during the boiling process are influenced by the oxygen tension. The figures show that the coagulation increases with the oxygen tension, whilst the peptic and tryptic cleavage decrease. As for the ammonia liberation, it is not influenced at all by the oxygen tension.

Altogether the same state of affairs is met with when we consider the last experiment in Table XXXXVI, where the same standard wort is boiled with hops. When the oxygen tension increases, the value of "coagulation + precipitation" also increases, whereas the values "peptic cleavage ÷ precipitation" and "tryptic cleavage" become less. The ammonia liberation remains quite unaffected. In this experiment we further find the amount of albumin II to diminish during boiling; this diminution, however, becomes less and less as the oxygen tension increases — in pure oxygen it is equal to 0.

Accordingly, although the results of our experiment are not well marked, and although they are rather puzzling in more than one respect, yet it is apparent that the oxygen of the atmospheric air plays some part in regard to the way in which the proteïd matters are influenced or transformed during wort and hop boiling, even though we are unable to state in detail what part it plays. At any rate, however, it is certain that the oxygen promotes the coagulation and also the precipitation of certain peptic cleavage products, whilst it tends to check the peptic and tryptic cleavage processes and does not exert any effect at all upon the ammonia liberation process.

(f) The Kind of Hops.

(See XIV. Series of Experiments, p. 264).

The inquiry now arises: Are the substances or groups of substances existing in the wort influenced differently by the different sorts or kinds of hops during the boiling process? We are here, however, only concerned with the chemical action of the hops, and not with the way in which it may perhaps influence the progress of fermentation or with the part it plays in regard to the aroma and flavour of the wort.

If we consider Table XXXXVII, p. 360, we find that the

TABLE XXXXVII.

The results calculated with corrections for the specific effect of hops.

Column marks	A	B	C	A_I	A_{II}	D	E	F	G	H	P	T	P+T	$\frac{A_I + A_{II}}{}$	N	pH	
300 cc. of standard wort boiled for 3 hours with 2 gr. of hops (Native place)	1000 cc. of wort contains															without corrections for the hops	Clarification of the wort
	gr. of extract in 1000 cc. of wort	gr. of ash	Acid ∞ cc. of normal NaOH	gr. of nitrogen in the form of													
				Albumin		peptic cleavage products = P			tryptic cleavage products = T		Cleavage products			Albumin I and II	total nitrogen		
				I	II	Denucleïn	Proteose	Peptone	Ammonia	Amine-Amid	peptic	tryptic	proteolytic				
Standard wort, unboiled	150.7	2.16	17.5	0.105	0.119	0.098	0.021	0.112	0.039	0.738	0.231	0.777	1.008	0.224	1.232	6.0	bad
Saaz (first class)	149.9	2.07	20.0	0.042	0.091	0.084	0.035	0.077	0.050	0.741	0.196	0.791	0.987	0.133	1.120	5.6	pretty good
Bavaria (first class)	149.8	2.00	19.5	0.042	0.112	0.070	0.007	0.105	0.050	0.706	0.182	0.756	0.938	0.154	1.092	5.6	pretty good
Moravia (first class)	150.1	2.17	20.5	0.042	0.098	0.084	0.021	0.084	0.050	0.727	0.189	0.777	0.966	0.140	1.106	5.6	pretty good
Stored country hops (second class)	149.6	2.13	19.5	0.042	0.091	0.091	0.021	0.091	0.053	0.731	0.203	0.784	0.987	0.133	1.120	5.6	pretty good
Holledaur	150.1	2.27	19.5	0.049	0.091	0.077	0.014	0.105	0.050	0.734	0.196	0.784	0.980	0.140	1.120	5.6	pretty good
England	150.0	2.07	20.0	0.049	0.112	0.070	0	0.119	0.053	0.689	0.189	0.742	0.931	0.161	1.092	5.6	pretty good
Analytical errors	0.2	0.06	0.4	0.012					0.007		0.007					0.1	

different sorts of hops examined exercise very nearly the same influence upon the extractive matters, mineral constituents and acidity of the wort, and that they augment the hydrogen ion concentration by exactly the same value (corresponding to a decrease of $p_H = 0.4$). As regards the clarifying faculty of the wort, all six sorts of hops have also had the same effect.

The way in which the proteïd matters are affected is illustrated by Table XXXXVIII.

TABLE XXXXVIII.

Column marks	$N' \div N$	$A_{II} \div A_{II}'$	$\frac{(P'+T')}{(P+T)}$	$\frac{(A_I+A_{II})}{(A_I'+A_{II}')}$	$T' \div T$	$G' \div G$	p_H
	Numerical values of the process						
300 cc. of standard wort boiled for 3 hours with 2 gr. of hops (Native place)	Coagulation + Precipitation	Albumin conversion + Coagulation of albumin II	Peptic action + Precipitation	Peptic action + Coagulation	Tryptic action	Ammonia liberation	changed in acid direction
Saaz (first class)	÷0.112	0.028	÷0.021	0.091	0.014	0.011	0.4
Bavaria (first class)	÷0.140	0.007	÷0.070	0.070	÷0.021	0.011	0.4
Moravia (first class)	÷0.126	0.021	÷0.042	0.084	0	0.011	0.4
Stored country hops (second class)	÷0.112	0.028	÷0.021	0.091	0.007	0.014	0.4
Holledaur	÷0.112	0.028	÷0.028	0.084	0.007	0.011	0.4
England	÷0.140	0.007	÷0.077	0.063	÷0.035	0.014	0.4
Analytical errors	0.007						0.1

All figures without signs are positive.

The six hop sorts may quite naturally be classed in three groups:

(I) Bavarian and English . . . . . Maximum effect.
(II) Moravian . . . . . Middle effect.
(III) Saaz, Stored Country hops, and Holledaur . Minimum effect.

The hops belonging to the First of these three groups are those which best promote the coagulation and precipitation of peptic cleavage products; consequently, the peptic and tryptic cleavages are more impaired by these than by the other hops. Albumin II is, so to speak, not affected by

TABLE XXXXIX.

The results calculated without corrections for the specific effect of hops.

Column marks	A	B	C	A_I	A_{II}	D	E	F	G	H	P	T	P+T	$A_I + A_{II}$	N
300 cc. of standard wort boiled for 3 hours with 2 gr. of hops (Native place)	gr. of extract in 1000 cc. of wort	1000 cc. of wort contains: gr. of ash	Acid = cc. of normal NaOH	gr. of nitrogen in the form of: Albumin I	Albumin II	peptic cleavage products = P: Denucleïn	Proteose	Peptone	tryptic cleavage products = T: Ammonia	Amine-Amid	cleavage products: peptic	tryptic	proteolytic	Albumin I and II	total nitrogen
Standard wort, unboiled	150.7	2.16	17.5	0.105	0.119	0.098	0.021	0.112	0.039	0.738	0.231	0.777	1.008	0.224	1.232
Saaz (first class)	152.3	2.49	22.5	0.042	0.084	0.091	0.042	0.077	0.056	0.784	0.210	0.840	1.050	0.126	1.176
Bavaria (first class)	152.5	2.37	22.5	0.042	0.098	0.084	0.021	0.098	0.056	0.763	0.203	0.819	1.022	0.140	1.162
Moravia (first class)	152.3	2.40	22.5	0.042	0.091	0.091	0.028	0.084	0.056	0.770	0.203	0.826	1.029	0.133	1.162
Stored country hops (second class)	151.7	2.43	22.0	0.042	0.084	0.098	0.028	0.091	0.053	0.766	0.217	0.819	1.036	0.126	1.162
Holledaur	152.3	2.49	22.0	0.049	0.084	0.084	0.021	0.105	0.056	0.763	0.210	0.819	1.029	0.133	1.162
England	152.0	2.31	22.0	0.049	0.098	0.084	0.014	0.112	0.056	0.749	0.210	0.805	1.015	0.147	1.162
Analytical errors	0.2	0.06	0.4	0.012					0.007		0.007				

them at all, that is to say, neither the albumin conversion process nor the coagulation of albumin II is furthered by them to any appreciable extent.

By the hops of the Third group the coagulation and precipitation are much less favoured than by the former sorts; but, in return, the peptic and tryptic cleavage processes are not so much weakened. On the other hand, albumin II is rather greatly influenced, being precipitated or coagulated in noticeable quantity.

The Second group must be placed between the two others, but nearer to the Third than to the First.

The ammonia liberation remains altogether unaffected by the hops, the deviations being less than the experimental error.

Thus, a difference has been established in regard to the way in which the different sorts of hops act upon the proteïd matters existing in boiling wort; it is true, however, that this difference is not very great and can hardly be supposed to have any appreciable importance from a practical point of view.

A summary of the extent to which the chemical composition of the wort is directly influenced by different sorts of hops is given in Table XXXXIX, the figures of which are calculated from those of Table XVII, without corrections for the specific effect of the hops.

A comparison between the six lowest series of figures will show that different hops give the boiled wort a somewhat different composition — the difference being the most marked in regard to the tryptic cleavage products —, but that the variations are too small to enable us, on the basis of these figures, to class the hops in definite groups.

F. Fermentation.

Yeast is a living organism which is able to act upon a nutrient medium in widely different ways, directly or indirectly, through the formation of various enzymes. Thus it can bring about reductions, being capable of converting furfurol into furfuryl or furyl alcohol, with formation of a crystalline substance partaking somewhat of the nature of a camphor[1]). It is probable

[1]) C. J. Lintner & H. J. v. Liebig, Zeitschr. physiol. Ch. **72**, 449 (1911).

that yeast may also produce or favour oxydations, inasmuch as aldehyde is produced in alcoholic fermentation[1]). Add to this, that yeast is able to form and decompose formic acid[2]), to separate carbon dioxyd from certain oxy-acids[3]), and to build up organic phosphides from certain carbohydrates and inorganic phosphides or phosphates[4]). — Thus, the transformations to which the fermentation process may give rise are of extremely different characters; but we have here to deal, in the main, only with those undergone by the nitrogenous matters in the course of alcoholic fermentation.

Horace T. Brown[5]) has arrived at the result that yeast is able to assimilate nitrogen from albumoses (proteoses) and peptones. These bodies, being marked colloids, cannot enter the yeast-cell by direct diffusion and give off nitrogen for the formation of protoplasm; but they must first be broken down to non-colloidal bodies, and must therefore undergo hydrolysis. Accordingly, for the above-mentioned nitrogenous matters to be utilisable as a source of nitrogen assimilation, the yeast-cell must give off proteolytic enzymes to the nutrient medium, since it appears indisputably from the very remarkable investigations of F. Ehrlich[6]) that ammonia is the only nitrogen source available for proteïd synthesis in fermentation. Hence the question arises, is the nitrogen loss which the nutrient medium suffers during fermentation entirely due to the assimilation?

Through some preliminary experiments which I undertook with common brewers' wort, in which I sowed out a few cells

[1]) A. Trillat, Compt. rend. de l'Acad. des scienc. **146**, 645 (1908). E. Kayser & A. Demolon, *ibid.* **148**, 103 (1909).

[2]) H. Franzen, Zeitschr. physiol. Ch. **64**, 169; **67**, 251; **70**, 19 (1910); **78**, 164 (1912).

[3]) E. Neuberg & L. Karczag, Bioch. Zeitschr. **36**, 68, 76 (1911); **37**, 170 (1911).

[4]) A. Harden & W. J. Young, Proceed. Roy. Soc. **77**, 405 (1906); **78**, 369 (1906); **80**, 299 (1908); **81**, 336 (1909). W. J. Young, Proceed. Ch. Soc. **23**, 65 (1907).

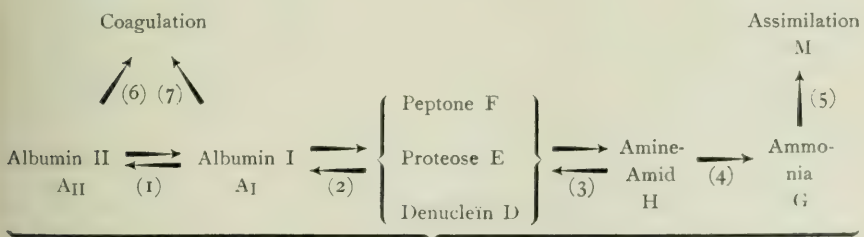
[5]) Journ. Instit. of Brew. **13**, 413 (1907).

[6]) Ber. d. deutsch. chem. Ges. **40**, 1027, 2538 (1907); **44**, 139, 888, 3737 (1911); **45**, 883, 1006 (1912). Bioch. Zeitschr. **36**, 477 (1911). See also O. Neubauer & K. Fromherz, Zeitschr. physiol. Ch. **70**, 326 (1911), and O. Schwarz, Bioch. Zeitschr. **33**, 30 (1911). According to J. Effront the ammonia liberation is due to an enzyme "amidase". Compt. rend. de l'Acad. des scienc. **146**, 779 (1908); **148**, 238 (1909).

of Saccharomyces Carlsbergensis, I tried to clear up the following two questions: — Do the cells secrete proteolytic enzymes? and is the total nitrogen loss of the nutrient liquid to be exclusively ascribed to nitrogen assimilation?

These experiments led to the very surprising result that the values of the total proteolytic decomposition were constantly negative, and that pretty considerable quantities of the nitrogen removed from the nutrient liquid could be readily dissolved in very dilute sodium hydroxide and consequently had been eliminated in the form of coagulates. Hence, the view of Horace T. Brown that the whole of the nitrogen loss is due to the nitrogen assimilation is evidently wrong, since part of it is attributable to the assimilation and the other part to a coagulation. The fact that a negative proteolysis occurs in fermentation in reality means that less complex nitrogenous compounds are condensed to more complex ones. On going over the literature on the subject, this view was fairly borne out: In 1906 I. Galimard & L. Lacomme[1]) mention some microbes which are capable of forming proteïd substances from certain amino-acids, and some years later it was established by G. Lockemann[2]) that the Tubercle Bacillus is able to build up coagulable proteïd substances from asparagine, and by K. Puriewitsch[3]) that Aspergillus niger can synthetise ammonia and amino-acids to proteïd substances.

On the basis of these facts we may draw up the following general scheme showing the transformations undergone by the nitrogenous organic matters during the fermentation process: —



(N) = total soluble nitrogen.

[1]) Compt. rend. de l'Acad. des scienc. **143**, 1182 (1906).
[2]) Zeitschr. physiol. Ch. **73**, 389 (1911).
[3]) Bioch. Zeitschr. **38**, 1 (1912).

The arrows indicate the directions in which the transformations may be supposed to take place or have been proved to take place, whereas the parenthetical figures accompanying each arrow are simply to be regarded as marks of the various transformation processes. The letters correspond with the column marks used in Table L.

On analytical examination we find 10,000 cc. of the experimental liquid to contain: —

Before Fermentation	— gr. of nitrogen in the form of		After Fermentation
N	Total soluble nitrogen	N'	
	Assimilated nitrogen.....	M	
$(A_I + A_{II})$	A_I ..... Albumin I	A_I'	$= (A_I + A_{II})'$
	A_{II}..... Albumin II	A_{II}'	
P	D..... Denucleïn.....	D'	
	E..... Proteose	E'	$= P'$
	F..... Peptone	F'	
T	H..... Amine-Amid	H'	
	G..... Ammonia	G'	$= T'$

By these determinations and with the help of the scheme on p. 365 we are enabled to calculate the numerical values of the following transformation processes or actions: —

Process	Value
(5) + (6) + (7)	= N ÷ N' = Sum of Assimilation and Coagulation.
(5)	= M = Sum of Assimilation.
(6) + (7)	= (N ÷ N') ÷ M = Sum of Coagulation.
(2)	= (P + T) ÷ (P + T)' ÷ M = Condensation of peptic decomposition products.
(3)	= T ÷ T' ÷ M = Condensation of amine-amid compounds.
(4)	= G' ÷ G + M = Ammonia liberation.

If on examination we find that the value [(P + T) ÷ (P + T)' ÷ M] or [T ÷ T' ÷ M] has a negative sign, this will evidently mean that there does not occur any condensation of peptic cleavage products to albumins or of amine-amid compounds to peptic cleavage products, but that we have before us a common peptic or tryptic cleavage (see the uppermost arrows). As we shall see later on, however, a great deal may be said in favour of the assumption that in the fermentation process we have to

do as well with condensations as with proteolytic decompositions, so that the processes (2) and (3) would possibly have to be considered as reciprocal. If, therefore, according to the above modes of calculation, we find the signs of the values [(P ÷ T) ÷ (P ÷ T)' ÷ M] and [T ÷ T' ÷ M] to be negative. this will simply mean that the proteolytic decompositions have the upper hand of the particular condensation processes. On the contrary, if the two values are found to have positive signs, it means that the condensation processes prevail over the proteolytic decompositions.

(a) The Primary Fermentation.

(See XV. Series of Experiments, p. 273).

Table L contains all the analytical values as calculated with regard to the unity 10,000 cc. of experimental liquid (nutrient medium), and from these figures the numerical values of the various transformation processes have been calculated by the fundamental rules mentioned in the introduction to the chapter dealing with fermentation. These values are set forth in Table LI. The requisite particulars regarding the arrangement of these experiments are contained in the two tables L and LI. It is to be observed that whilst in the first five experiments the nutrient liquid used is common filter-bag wort, I have in Experiment VI employed an artificial nutrient liquid (see p. 272).

An inspection of the first three series of figures in Table L will immediately show that the calculation of the extract amount of the original wort from the quantities of extract and alcohol existing in the fermenting liquid does not give quite reliable results. Generally we find too low values for the extract amount of the original wort; indeed, the discrepancies may often be rather considerable. In some — but very few — cases, however, we meet with values which are slightly superior to the standard level That this error occurs particularly in those experiments where the fermentation has been carried out with continual supply of air, is a matter of course, since the air supplied is more or less completely saturated with vapours of water and alcohol in a definite proportion, thus removing a certain amount of alcohol from the experimental liquid. The case is of course similar in the experiments made without access of air, in which it is the carbonic acid set free in the fermentation which carries off a

TABLE I.

Experiment N	Column marks: The experimental liquid fermented at 15°–17° with		in — days	A: gr. of extract	Alk: gr. of alcohol	B: gr. of extract in the standard wort calculated, [1]	C: gr. of ash	AI: ccm. of normal NaOH	AII: ccm. of normal NaOH	D: Albumin I	E: Albumin II	F: peptic cleavage products — Deuteroalbumin	G: peptic cleavage products — Proteose	H: peptic cleavage products — Peptone	I: tryptic cleavage prod. — Ammonia	K: tryptic cleavage prod. — Amino-Amid	N: total nitrogen	AI+AII: Albumin I and II	P: Cleavage products — peptic	T: Cleavage products — tryptic	P+T: Cleavage products — proteolytic	M: assimilated nitrogen [2]	O: peptol bindings	PH
				10,000 cc. of experimental liquid contains						gr of nitrogen in the form of														
I	The standard wort itself			1271	0	1271	20.2	200	0.56	0.49	1.12	0.63	0.56	0.56	6.58	10.50	1.05	2.31	7.14	9.45	0	3.99	5.4
	Saccharomyces Carlsbergensis	without air supply	4	1252	10	1272	19.7	200	0.63	0.63	0.91	0.49	0.56	0.56	6.58	10.36	1.26	1.96	7.14	9.10	0.07	3.92	5.4
			11	621	337	1280	19.3	215	0.56	0.28	0.98	0.77	0.56	0.42	5.11	8.68	0.84	2.31	5.53	7.84	1.19	3.01	5.2
			18	460	407	1256	18.8	200	0.49	0.56	0.77	0.56	0.56	0.42	4.90	8.26	1.05	1.89	5.32	7.21	1.47	2.73	5.0
			29	445	395	1218	18.3	200	0.49	0.35	0.91	0.70	0.42	0.42	4.83	8.12	0.84	2.03	5.25	7.28	1.54	2.59	5.0
		with air supply	4	1264	10	1284	20.5	200	0.63	0.63	0.91	0.49	0.56	0.56	6.58	10.36	1.26	1.96	7.14	9.10	0.07	3.92	5.4
			11	524	372	1252	19.0	225	0.49	0.14	0.98	0.98	0.28	0.21	4.62	7.70	0.63	2.24	4.83	7.07	1.82	2.73	5.2
			18	460	389	1221	18.4	220	0.49	0.35	0.84	0.70	0.35	0.28	4.69	7.70	0.84	1.89	4.97	6.86	1.82	2.31	4.6
			29	450	337	1109	18.2	230	0.49	0.07	0.98	0.84	0.35	0.28	4.55	7.56	0.56	2.17	4.83	7.00	2.03	2.24	4.6
II	The standard wort itself			1283	0	1283	21.2	180	0.56	0.49	0.84	0.56	0.63	0.42	6.02	9.52	1.05	2.03	6.44	8.47	0	3.57	5.4
	Saccharomyces Pastorianus I	without air supply	5	—	81	—	20.2	205	0.49	0.42	0.84	0.63	0.49	0.35	5.18	8.40	0.91	1.96	5.53	7.49	0.49	2.87	4.8
			12	729	283	1283	20.3	250	0.49	0.28	0.91	0.70	0.42	0.14	5.18	8.12	0.77	2.03	5.32	7.35	0.77	2.45	4.4
			19	525	383	1274	21.2	265	0.42	0.35	0.91	0.63	0.42	0.14	4.97	7.84	0.77	1.96	5.11	7.07	1.05	2.24	4.3
			26	488	377	1225	20.5	265	0.42	0.14	1.05	0.70	0.35	0.14	4.90	7.70	0.56	2.10	5.04	7.14	1.05	2.45	4.3
		with air supply	5	1110	86	1278	20.1	205	0.42	0.35	0.91	0.70	0.42	0.28	5.18	8.26	0.77	2.03	5.46	7.49	0.63	2.66	4.8
			12	637	314	1251	19.8	250	0.42	0.21	0.91	0.77	0.35	0.14	4.76	7.56	0.63	2.03	4.90	6.93	1.05	2.24	4.4
			19	500	372	1228	19.3	270	0.42	0.21	0.91	0.77	0.28	0.07	4.90	7.56	0.63	1.96	4.97	6.93	1.19	1.96	4.2
			26	480	366	1196	20.1	275	0.35	0.07	1.05	0.84	0.21	0.07	4.83	7.42	0.42	2.10	4.90	7.00	1.19	2.24	4.2
III	The standard wort itself			1324	0	1324	21.3	185	0.63	0.35	1.05	0.70	0.42	0.42	6.23	9.80	0.98	2.17	6.65	8.82	0	3.43	5.1
	Torula B Brettanomyces)	without air supply	6	1322	0	1322	21.8	180	0.70	0.35	0.98	0.63	0.49	0.49	6.02	9.66	1.05	2.10	6.51	8.61	0	3.36	5.1
			16	1199	68	1332	20.8	220	0.70	0.35	0.98	0.63	0.35	0.35	5.60	8.96	1.05	1.96	5.95	7.91	0.56	3.15	5.0
			26	1169	76	1318	—	240	0.63	0.42	0.98	0.49	0.35	0.35	5.60	8.82	1.05	1.82	5.95	7.77	0.63	3.08	4.7
			47	1162	81	1320	21.1	265	0.70	0.49	0.91	0.35	0.49	0.28	5.60	8.82	1.19	1.75	5.88	7.63	0.63	3.08	4.7
		with air supply	6	1321	0	1321	21.6	180	0.63	0.35	1.05	0.70	0.28	0.42	6.23	9.66	0.98	2.03	6.65	8.68	0	3.36	5.1
			16	1187	63	1310	20.0	315	0.56	0.21	1.05	0.77	0.21	0.28	5.46	8.54	0.77	2.03	5.74	7.77	0.84	2.94	4.7
			26	1124	81	1282	—	450	0.56	0.35	0.98	0.63	0.21	0.28	5.39	8.40	0.91	1.82	5.67	7.49	0.98	2.87	4.4

	The standard wort itself		1288	0	1288	21.1	175	0.03	0.42	0.98	0.56	0.49	0.35	5.81	9.24	1.05	2.03	6.16	8.19	0	3.20	5.3
IV	Saccharomyces apiculatus	without air supply	5	1169	61	1288	21.5	225	0.49	0.21	0.91	0.56	0.42	0.42	5.67	8.68	0.70	1.89	6.09	7.98	0.35	3.01	4.7
			12	1164	61	1283	20.4	225	0.49	0.28	0.84	0.49	0.56	0.42	5.60	8.68	0.77	1.89	6.02	7.91	0.35	3.08	4.6
			20	1165	48	1259	20.1	270	0.49	0.21	0.70	0.49	0.56	0.49	5.60	8.54	0.70	1.75	6.09	7.84	0.42	3.01	4.5
			26	1145	41	1225	20.7	300	0.49	0	0.91	0.56	0.42	0.49	5.53	8.40	0.49	1.89	6.02	7.91	0.42	3.08	4.5
		with air supply	5	1160	56	1270	20.7	225	0.35	0.21	0.98	0.70	0.14	0.42	5.46	8.26	0.56	1.82	5.88	7.70	0.63	3.01	4.7
			12	1160	—	—	20.7	240	0.49	0.14	0.77	0.56	0.49	0.49	5.32	8.26	0.63	1.82	5.81	7.63	0.63	2.80	4.6
			20	1164	41	1244	20.1	275	0.49	0	0.91	0.63	0.49	0.49	5.25	8.26	0.49	2.03	5.74	7.77	0.63	2.94	4.5
			26	1154	31	1215	20.8	305	0.49	0	0.91	0.63	0.28	0.49	5.60	8.40	0.49	1.82	6.09	7.91	0.70	3.01	4 5
	The standard wort itself		1233	0	1233	20.6	170	0.70	0.21	0.98	0.49	0.35	0.35	5.88	8.96	0.91	1.82	6.23	8.05	0	3.22	5.2
V	Monilia candida	without air supply	7	1110	66	1239	19.8	185	0.49	0.35	1.05	0.49	0.28	0.35	5.39	8.40	0.84	1.82	5.74	7.56	0.42	2.80	5.0
			15	1074	81	1232	18.3	200	0.42	0.49	0.91	0.42	0.49	0.35	5.18	8.26	0.91	1.82	5.53	7.35	0.42	2.80	4.8
			27	1014	106	1221	18.0	215	0.28	0.35	1.12	0.49	0.42	0.35	5.25	8.26	0.63	2.03	5.60	7.63	0.42	2.80	4.8
		with air supply	7	856	—	—	17.6	195	0.42	0.35	0.84	0.49	0.21	0.35	3.92	6.58	0.77	1.54	4.27	5.81	1.89	2.03	4.7
			15	699	—	—	—	250	0.28	0.14	0.98	0.70	0.21	0.35	3.78	6.44	0.42	1.89	4.13	6.02	2.10	1.96	4.2
			27	467	—	—	17.9	305	0.21	0.14	0.91	0.63	0.28	0.21	3.78	6.16	0.35	1.82	3.99	5.81	2.17	1.96	4.2
	The nutrition liquid		1226	0	1226	18.1	175	0	0	0	0	0.14	0	7.14	7.28	0	0.14	7.14	7.28	0	3.78	4.7
VI	Saccharom. Carlsberg.	without air supply	6	1228	0	1228	17.7	160	0	0	0	0	0.14	0.07	7.07	7.28	0	0.14	7.14	7.28	0	3.92	4.7
			13	1230	Spor	1230	17.2	175	0	0	0	0	0.21	0	7.07	7.28	0	0.21	7.07	7.28	0	4.06	4.5
			24	1245	15	1274	17.0	185	0	0	0	0	0.21	0	7.07	7.28	0	0.21	7.07	7.28	0	3.92	4.3
			32	1250	21	1291	18.0	185	0	0	0	0	0.21	0	7.07	7.28	0	0.21	7.07	7.28	0	3.85	4.2
	Saccharomyces apiculatus	without air supply	6	1228	0	1228	17.8	160	0	0	0	0	0.21	0.14	6.93	7.28	0	0.21	7.07	7.28	0	4.06	4.7
			13	1233	0	1233	17.5	200	0	0	0	0	0.14	0	7.14	7.28	0	0.14	7.14	7.28	0	4.20	4.6
			24	1240	0	1240	16.8	175	0	0	0	0	0.14	0	7.14	7.28	0	0.14	7.14	7.28	0	4.06	4.6
			32	1245	0	1245	17.9	165	0	0	0	0	0.21	0	7.07	7.28	0	0.21	7.07	7.28	0	3.99	4.5
	Analytical errors			2.0		4.0	0.6	4.0			0.12			0.07				0.07			0.11	0.1

[1]) gr. of alcohol × 1.956 + gr. of extract = gr. of extract in the standard wort.

[2]) The figures indicate the amount of nitrogen of which the wort has been deprived by assimilation.

certain quantity of alcohol. Hence, the reason why the extract content of the original wort is found to be lower than expected is quite obvious. In those cases where the deviation goes in the opposite direction for instance Experiment I without air 11 days and with air 4 days, and III without air 16 days) we have evidently to do either with an analytical error, or else the reason must be sought in the circumstance that in a given unity of time the amount of disaccharides inverted to monosaccharides is superior to that of monosaccharides fermented.

From what I have here said it will be evident why in the interpretation of my fermentation experiments I have not taken into account the alcohol formed, but exclusively the extract figures arrived at, or, more exactly, the amount of extract consumed in the fermentation, partly in the formation of alcohol and acid, and partly in building up the new-formed cells. Unfortunately I have not been able to determine the proportion of extract required in each particular case by the cell-formation.

Finally, it appears by Table L that the hydrogen ion concentration increases (p_H decreases) more or less according as fermentation progresses, at least up to a definite point, the close of the primary fermentation. In no case, however, we arrive at a higher hydrogen ion concentration than 0.357×10^{-4} ($\backsim p_H = 4.2$). We shall see later on that the hydrogen ion concentration shows a tendency to decrease in the course of the secondary fermentation when the latter is continued during a sufficiently long time, and consequently a great deal favours the belief that the five organisms experimented with do not support a higher hydrogen ion concentration than 0.357×10^{-4} without the vitality being impaired or perhaps even entirely destroyed. If we make a comparison between the hydrogen ion exponents and the figures denoting how many gr. of extract there are contained in 10,000 cc. of experimental liquid, we arrive at the conclusion that the hydrogen ion concentration steadily increases during the course of the primary fermentation; but after the completion of the latter no increase is observable any more in the hydrogen ion concentration. It is also easily perceptible — more especially from the experiments with Saccharomyces Carlsbergensis and Torula B — that, when air (oxygen) is supplied to the fermenting liquid, both the increase of the hydrogen ion concen-

tration as well as the consumption of extractive matters during fermentation are promoted. There does not, however, exist any constant relation between the changes of these two values.

We now pass on to consider Table LI, which contains the numerical values calculated for the various transformation processes, and will give a general idea of the transformations which have taken place within the nitrogenous organic matters.

Before passing on to deal with the behaviour of these matters in fermentation, it may be as well to cast a cursory glance at the two columns expressing ash consumed (column 3) and acidity (column 4).

It will then immediately be observed that a small portion of the mineral matters existing in the nutrient liquid is used in the new-formation of cells; but it is still more apparent that the consumption of mineral matters is larger in those cases in which the fermentation was conducted with continuous supply of air (oxygen) as compared with those in which this was not the case. Saccharomyces apiculatus, however, forms an exception to this rule.

As regards the increase of acidity, we arrive at a similar result. But this column also shows that the different organisms behave very differently in regard to their power of forming acids. From the figures it may be inferred that the tendency to form acid is least (*nil*) in Saccharomyces Carlsbergensis, somewhat greater in Monilia candida, still greater in Torula B and Saccharomyces Pastorianus I, and greatest in Saccharomyces apiculatus, — providing no air be supplied during fermentation. If, on the contrary, air be continually supplied during the whole course of fermentation, the amounts of acid produced by the five organisms are seen to increase, though not in the same degree. The influence of the air is quite enormous in the case of Torula B, fairly considerable in Monilia candida, small in Saccharomyces Carlsbergensis, and extremely small in Saccharomyces Pastorianus I and Saccharomyces apiculatus.

To get a clear insight into the state of affairs, regard must necessarily be had to the mode of action or power of reaction exhibited by the various organisms towards the chief kinds of

TABLE LI.

Column marks			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
The results calculated per			10,000 cc. of experimental liquid												% of total nitrogen of the standard wort consumed by		
Experiment No	Found for the process							(6+7)	(5)	2)	3	(4)	(0÷0)				
	Standard wort fermented at 15° – 17°			consumed						condensation of							
	with	in — days	gr. of extract	% of extract contained in the standard wort	gr. of ash	increase in acidity ≈ cc. of norm. NaOH	pH displaced in acid direction	total nitrogen coagulation	total nitrogen assimilation	peptic cleavage products	tryptic cleavage products	ammonia liberation	peptid bindings decrease with the value	Gr. of extract consumed per gr. of assimilated nitrogen	coagulation	assimilation	Sum
I	Saccharomyces Carlsbergensis, without air supply	4	19	1.5	0.5	0	0	0.07	0.07	0.28	÷0.07	0.07	0.07	271	0.7	0.7	1.4
		11	650	51.1	0.9	15	0.2	0.63	1.19	0.42	0.42	1.05	0.98	546	6.0	11.3	17.3
		18	811	63.8	1.4	0	0.4	0.77	1.47	0.77	0.35	1.33	1.26	552	7.3	14.0	21.3
		29	826	64.9	1.9	0	0.4	0.84	1.54	0.63	0.35	1.40	1.40	536	8.0	14.6	22.6
	Saccharomyces Carlsbergensis, with air supply	4	7	0.6	÷0.3	0	0	0.07	0.07	0.28	÷0.07	0.07	0.07	100	0.7	0.7	1.4
		11	747	58.8	1.2	25	0.2	0.98	1.82	0.56	0.49	1.47	1.26	411	9.3	17.3	26.6
		18	811	63.8	1.8	20	0.8	0.98	1.82	0.77	0.35	1.54	1.68	445	9.3	17.3	26.6
		29	821	64.6	2.0	30	0.8	0.91	2.03	0.42	0.28	1.75	1.75	404	8.7	19.3	28.0
II	Saccharomyces Pastorianus I, without air supply	5	—	—	1.0	25	0.6	0.63	0.49	0.49	0.42	0.42	0.70	—	6.6	5.1	11.7
		12	554	43.2	0.9	70	1.0	0.63	0.77	0.35	0.35	0.49	1.12	719	6.6	8.1	14.7
		19	758	59.1	0	85	1.1	0.63	1.05	0.35	0.28	0.77	1.33	722	6.6	11.0	17.6
		26	795	61.9	0.7	85	1.1	0.77	1.05	0.28	0.35	0.77	1.12	757	8.1	11.0	19.1
	Saccharomyces Pastorianus I, with air supply	5	173	13.5	1.1	25	0.6	0.63	0.63	0.35	0.35	0.49	0.91	275	6.6	6.6	13.2
		12	646	50.4	1.4	70	1.0	0.91	1.05	0.49	0.49	0.77	1.33	615	9.6	11.0	20.6
		19	783	61.0	1.9	90	1.2	0.77	1.19	0.35	0.28	0.84	1.61	658	8.1	12.5	20.6
		26	803	62.6	1.1	95	1.2	0.91	1.19	0.28	0.35	0.84	1.33	675	9.6	12.5	22.1
III	Torula B. (Pretanomyces), without air supply	6	2	0.2	÷0.5	÷5	0	0.14	0	0.21	0.14	0.07	0.07	—	1.4	0	1.4
		16	125	9.4	0.5	35	0.1	0.28	0.56	0.35	0.14	0.49	0.28	223	2.9	5.7	8.6
		26	155	11.7	—	55	0.4	0.35	0.63	0.42	0.07	0.56	0.35	246	3.6	6.4	10.0
		47	162	12.2	0.2	80	0.4	0.35	0.63	0.53	0.14	0.49	0.35	257	3.6	6.4	10.0
	Torula B. (Pretanomyces), with air supply	6	3	0.2	÷0.3	÷5	0	0.14	0	0.14	0	0	0.07	—	1.4	0	1.4
		16	137	10.3	1.3	130	0.4	0.42	0.84	0.21	0.07	0.70	0.49	163	4.3	8.6	12.9
		26	200	15.1	—	265	0.7	0.42	0.98	0.35	0	0.84	0.56	204	4.3	10.0	1.43
		[illegible]	204	22.2	2.0	1205	0.0	0.56	1.82	0.28	÷0.21	1.40	1.26	162	5.6	18.7	24.3

IV	Saccharomyces apiculatus	without air supply	12	124	9.6	0.7	50	0.7	0.21	0.35	÷0.14	÷0.28	0.42	0.28	340	2.3	3.8	6.1
			20	123	9.6	1.0	95	0.8	0.28	0.42	÷0.07	÷0.21	0.42	0.21	354	2.3	3.8	6.1
			26	143	11.1	0.4	125	0.8	0.42	0.42	÷0.14	÷0.28	0.56	0.28	293	3.0	4.5	7.5
		with air supply	5	128	9.9	0.4	50	0.6	0.35	0.63	÷0.14	÷0.35	0.70	0.28	340	4.5	4.5	9.0
			12	128	9.9	0.4	65	0.7	0.35	0.63	÷0.07	÷0.28	0.77	0.49	203	3.8	6.8	10.6
			20	124	9.6	1.0	100	0.8	0.35	0.63	÷0.21	÷0.21	0.77	0.35	203	3.8	6.8	10.6
			26	134	10.4	0.3	130	0.8	0.14	0.70	÷0.42	÷0.63	0.84	0.28	197	3.8	6.8	10.6
V	Monilia candida	without air supply	7	123	9.9	0.8	15	0.2	0.14	0.42	0.07	0.07	0.42	0.42	191	1.5	7.6	9.1
			15	159	12.9	2.3	30	0.4	0.28	0.42	0.28	0.28	0.42	0.42	293	1.6	4.7	6.3
			27	219	17.7	2.6	45	0.4	0.28	0.42	0	0.21	0.42	0.42	379	3.1	4.7	7.8
		with air supply	7	377	30.6	3.0	25	0.5	0.49	1.89	0.35	0.07	1.89	1.19	521	3.1	4.7	7.8
			15	534	43.3	—	80	1.0	0.42	2.10	÷0.07	0	2.10	1.26	200	5.5	21.1	26.6
			27	766	62.1	2.7	135	1.0	0.63	2.17	0.07	0.07	2.03	1.26	254	4.7	23.4	28.1
VI	Saccharomyces Carlsbergensis	without air supply	6	÷ 2	—	0.4	÷15	0	0	0	0	0	0.07	÷0.14 *)	353	7.0	24.2	31.2
			13	÷ 4	—	0.9	0	0.2	0	0	0	0.07	0	÷0.28	—	0	0	0
			24	÷19	—	1.1	10	0.4	0	0	0	0.07	0	÷0.14	—	0	0	0
			32	÷24	—	0.1	10	0.5	0	0	0	0.07	0	÷0.07	—	0	0	0
	Saccharomyces apiculatus	without air supply	6	÷ 2	—	0.3	÷15	0	0	0	0	0.07	0.14	÷0.28	—	0	0	0
			13	÷ 7	—	0.6	25	0.1	0	0	0	0	0	÷0.42	—	0	0	0
			24	÷14	—	1.3	0	0.1	0	0	0	0	0	÷0.28	—	0	0	0
			32	÷19	—	0.2	÷10	0.2	0	0	0	0.07	0	÷0.21	—	0	0	0
Analytical errors				2.0		0.6	4.0	0.1	0.07					0.11				

All figures without signs are positive.

:) The determination appears to be incorrect.

*) Negative signs designate that the amount of peptid linked nitrogen increases.

sugar. Saccharomyces Carlsbergensis and Pastorianus I readily ferment the three important sugars: cane-sugar (saccharose), maltose and glucose. These are also fermented by Monilia candida and Torula B, but less readily, at least as far as the two disaccharides are concerned. By Saccharomyces apiculatus only glucose can be fermented[1]).

The different modes of action of the organisms will be clearly seen by an inspection of the columns (1) and (2).

In the Experiments I and II we have reached the maximum of extract consumption after about 19 days' fermentation, with or without access of air. In Experiment V the greatest extract consumption is reached only after 27 days' fermentation with supply of air; in Experiment III only 22 % of the extract of the standard wort has been consumed after 47 days' fermentation with access of air, and, finally, in Experiment IV only 11 % of the extract has been used up after 26 days' fermentation with or without air.

A real estimate of the active powers of the different organisms cannot of course be based upon the figures referred to, as the consumption of extract need not bear any constant relation to the number of new cells formed at the same time; indeed, there hardly exists any such constant relation. Consequently, even if we knew the number of the cells formed in a given unit of time, this material would hardly enable us to form a correct estimate of the vital powers of the different organisms. The action of the cells emanates from the protoplasm; therefore, seeing that the protoplasm consists essentially of proteïd or allied matters, I believe we are justified in assuming that the relation between the vital powers of the different organisms may be safely measured by the nitrogen amount assimilated. If this be so, it follows that the figures indicating how many gr. of extract are consumed per gr. of nitrogen assimilated may be taken as a measure of the relation between the active powers of the different organisms. These figures are brought together in column (12), and if we follow them through the table, beginning with the experiments conducted without supply of air, we shall find the active power to grow with the time of action up to a certain

[1]) See in other respects A. Klöcker, Compt. rend. des travaux du Laborat. de Carlsb. **10**, 113 (1911).

maximum — which has not been attained in all the experiments —, after which it decreases somewhat, though not much. Besides, it appears that the relation between the active powers of the five organisms diminishes in the following order: —

(1) Saccharomyces Pastorianus I (greatest active power).
(2) Saccharomyces Carlsbergensis.
(3) Monilia candida.
(4) Saccharomyces apiculatus.
(5) Torula B (least active power).

By following the same series of figures with regard to those experiments where fermentation was carried out with access of air, we shall meet with a full corroboration of the above observations; but at the same time it will be seen that the active power is weakened when the oxygen of the air is co-operating in fermentation, and this applies to all the five organisms. Moreover, column (7) shows that the nitrogen assimilation is promoted by the co-operation of the air, and consequently these considerations may be summed up in the following conclusion, which of course will hold good only of aërobian organisms.

The oxygen of the air considerably promotes the vegetative propagation of the organisms, but not the chemical power of each cell, which rather appears to be weakened.

In the case of Saccharomyces apiculatus it is obvious that the chemical power of the cell is impaired by the oxygen of the air, since the access of air does not result in a larger consumption of extract, although the amount of nitrogen assimilated is almost doubled. The same holds good of Saccharomyces Carlsbergensis. — It is worthy of remark that the vegetative propagation of Torula B and Monilia candida is particularly promoted when air is supplied during fermentation. These results agree with practical experience and, at least in a certain measure, they go to prove the correctness of the fermentation theory set forth by Pasteur[1]).

We now pass on to inquire into the way in which the nitrogenous matters existing in the nutrient liquid are acted upon by the five organisms under consideration during their

[1]) Ann. de Chim. et de Phys. [3] **58**, 323 (1860).

vegetative propagation. It will be well to take as a starting-point those experiments which were undertaken without supply of air, because the results calculated from them exhibit a greater uniformity between the samples as compared with those where the air had access[1]). We now have first to explain the figures grouped in columns (6), (7), (8), (9), (10) and (11) of Table LI.

Curve Table 5.

——————— = Coagulation.
— — — — — — — — = Assimilation.
. . . . . = Condensation of peptic decomposition products.
— · — · — · — · = Condensation of tryptic decomposition products.
— × — × — × — × = Ammonia liberation.
+ + + + + + = Decrease in the amount of peptid linked nitrogen.

To make the six series of figures more perspicuous, which relate to the experiments without supply of air during fermentation, they are rendered graphically on Curve Table 5, where the abscisses represent the duration in days, and the ordinates the extent of the transformation in question expressed in gr. of nitrogen in 10,000 cc. of experimental liquid. If now we again con-

[1]. The reason why it is so must doubtless be sought in the circumstance that I have never made a point of supplying exactly the same quantity of air to all the flasks used in the same series of experiments. Indeed, the amount of air was even increased on purpose in process of time.

front Table LI with Curve Table 5, a cursory glance at the results of the transformations will immediately show that there is a very essential difference between the qualitative and quantitative powers of reaction of the five organisms. It will thus at once be noticed that there are, generally, considerable quantitative differences between the curves, and, more particularly, that the relations of the different curves to one another vary a great deal in the five experimental series. By means of this latter factor (the mutual situation of the curves) the five organisms may be easily distinguished from one another.

To get a clear insight into the transformations we must first try to realise, which of these processes take place in the cell itself, and which are brought about outside the cell. The determining factor in this direction is of course the faculty of diffusion of the different compounds. Since only ammonia and the different amine-amid compounds are to be classed among the readily diffusible substances, we may assume that the assimilation process takes place exclusively within the cell, whilst the albumin coagulation, the different condensation processes and the proteolytic decomposition processes (negative condensations) always go on outside the cell. Whether the splitting of peptid bindings and ammonia liberation take place in the cell or outside, cannot be decided with certainty; but the facts relating to the diffusion render it probable that these processes may go on both within as well as outside the cell. But they are most likely to take place outside.

In regard to all the five organisms we now find that the following processes increase with the time of fermentation: the coagulation, assimilation and ammonia liberation, and the process in which peptid bindings are split up, and which for the sake of convenience I may call the peptid splitting process[1]). This increase is greatest in the first periods of time (primary fermentation); during the later experimental periods (secondary fermen-

[1]) It is to be observed that in Table LI and Curve Table 5 I have given this process a positive sign, although it has been established that the number of peptid bindings diminishes in the course of fermentation. Therefore the fact that on the Curve Table the peptid curve coïncides, for instance, with that relating to ammonia liberation, does not mean that these two curves or processes are identical, but only that they are, as it were, reflected images of each other.

tation it is of minor importance and soon ceases altogether; in one case (Saccharomyces Pastorianus I) it may with regard to the peptid splitting process even take the reverse course. The discrepancies which the curves exhibit from the principal rule here advanced may, I believe, be said to be relatively so inconsiderable that they may be ascribed only to experimental error. The conclusion arrived at is therefore, that in the course of the fermentation process the greatest transformation occurs within the group of nitrogenous matters in the period of time designated as primary fermentation, whereas such transformations as we may expect to meet in secondary fermentation must be exceedingly small (we shall speak of this point later on, in connection with secondary fermentation).

Also with regard to the peptic and tryptic condensation processes the maximum effect appears to occur in primary fermentation. If fermentation is continued beyond this point, these processes are nearly always found to decrease in numerical value, and on account of this very peculiarity I believe we must look upon them as reciprocal processes. It is accordingly to be supposed that both proteolytic (peptic and tryptic) condensations as well as proteolytic decompositions take place in the fermentation process. But if this be so, it is quite evident that the values of the extent of the condensation processes given in Table LI and Curve Table 5 are in reality an expression of the relation between the numerical values of the condensation and decomposition processes. This does not imply that the curves lose their value; in fact, it can always be seen from them whether the condensation processes prevail over the decomposition processes, or whether perhaps the case is the reverse. Thus it will be seen that Saccharomyces apiculatus acts in quite a different way upon the nitrogenous organic matters, as compared with the other four organisms, in that the proteolytic decomposition processes induced by the former gain the ascendency over the proteolytic condensation processes, whilst the case is the reverse with Saccharomyces Carlsbergensis, Saccharomyces Pastorianus I, Torula B and Monilia candida. Hence we learn that, quantitatively, the same nitrogenous organic substances are differently influenced by the different organisms.

A great qualitative difference is also observable in the mode

of action of the various organisms. With regard to those where the proteolytic condensation processes preponderate over the proteolytic decomposition processes, we arrive at the following results: —

(I) In the case of Saccharomyces Carlsbergensis the peptid splitting process is very nearly a "reflected image" of the ammonia liberation process, the curves relating to these two processes being almost in congruity. Both these processes show a rather lower numerical value as compared with the assimilation process

(II) With Saccharomyces Pastorianus I the peptid splitting process has a considerably greater numerical value than the assimilation process, and — just as with Saccharomyces Carlsbergensis — the latter process shows a noticeably higher value than the ammonia liberation process.

(III) Torula B, like the two preceding organisms, exhibits a greater numerical value of the assimilation process, as against the ammonia liberation process, whereas the peptid splitting process has a markedly lower value than the ammonia liberation process. The peptid splitting in this case proves to be a "reflected image" of coagulation.

(IV) Finally, with Monilia candida the assimilation and ammonia liberation processes have equal values, and the peptid splitting process is absolutely a "reflected image" of both — the three curves cover on the Table.

It deserves notice that in the case of Saccharomyces apiculatus the ammonia liberation process is found to have a higher numerical value than assimilation, a fact which tallies perfectly well with the result obtained above in respect of this organism, namely that the proteolytic decomposition processes predominate over those of proteolytic condensation.

If now we pass on to inquire into the power of reaction exhibited by the organisms under consideration when fermentation is conducted with continual supply of atmospheric air (oxygen), it appears that the numerical value increases in each of the above transformation processes, excepting the vital or chemical working power of the cell, which is rather weakened. Further, we find that — as mentioned before — the oxygen of the air tends to promote more particularly the transformation processes induced by Torula B

and Monilia candida. With regard to the qualitative side of the action, which manifests itself by the correlations of the curves, we meet with but one exception to the rules established above, namely with Monilia candida, where the value of the peptid splitting process is lower than that of assimilation and ammonia liberation when fermentation takes place with supply of air, whereas all the three processes have the same numerical value when the air has not access.

Since malt wort (filter-bag wort) contains a variety of nitrogenous organic compounds, we may infer from these observations that different organisms do not attack or break down the same nitrogenous compound or compounds with the same facility, but that one organism shows a special tendency to attack or break down certain nitrogenous organic substances, whilst others are acted upon in a similar way by another. If therefore we take into account the fact that the relation between the numerical values of the three transformation processes assimilation, ammonia liberation and peptid splitting is changed very differently by different organisms, this must, I believe, imply that different organisms are capable of solving different bindings or combinations in the molecules of nitrogenous organic compounds. We have been led to this view especially by the different relation of peptid splitting to the other two processes, so that these very experiments furnish a significant example of the way in which the peptid splitting and other proteïd transformation processes act as supplements to each other.

I may here add a brief remark concerning the behaviour of albumin II during the fermentation process. An inspection of column (A_{II}) in Table L will show that the quantity of albumin II diminishes but very little during fermentation, at any rate when air is not supplied. The greatest effect in this direction is met with in the case of Saccharomyces apiculatus, which causes albumin II to disappear entirely, whereas Torula B and Monilia candida show a slight effect in the opposite direction. When, however, air is supplied, we throughout find an appreciable falling off in the quantity of albumin II; but it cannot be ascertained whether this is due to a certain proportion of albumin II being converted to albumin I, or perhaps to some albumin II being coagulated out.

Finally, we have to consider the results obtained by the

VIth and last fermentation experiment, which was made with an artificial nutrient liquid not containing any other nitrogenous matter than asparagine. In two series of flasks were sown in the usual manner very small quantities of vigorous pure seed cultures of Saccharomyces Carlsbergensis and Saccharomyces apiculatus, respectively. Since part of the cane-sugar existing in the nutrient liquid has been inverted during sterilisation, the consequence is that there are carbohydrates present which can be fermented by the two organisms under consideration. My reason for choosing these two species was the fact that, of all the five used in my principal experiments, they exhibited the most marked contrast in regard to the mode of action, at all events when fermentation was conducted without supply of air. It was therefore to be expected that this experiment might give some information that would in some way or other corroborate or disprove the correctness of the conclusion arrived at before, namely that different organisms attack different bindings or combinations in the molecules of nitrogenous organic compounds.

Now the figures given in Table LI, Experiment VI, immediately prove that neither Saccharomyces Carlsbergensis nor Saccharomyces apiculatus has been able to act upon asparagine; for all the columns indicating transformation within the nitrogenous matters constantly show the value 0, or, at most, so low figures that these must be referred to "Experimental error". It is only in the column (11) that we meet with figures noticeably greater than the error; but the discrepancies are not sufficiently great to warrant us in drawing any inference. Strange enough, the amount of peptid linked nitrogen is everywhere found to tend towards increasing during fermentation (see note p. 373). The meaning of this may be that the two organisms attempt, as it were, to build up more complex nitrogenous matters (polypeptides?) from asparagine, but are unequal to the task. Accordingly, the experiment under consideration neither confirms nor disproves the correctness of the conclusion drawn on p. 380, but simply shows this much, that asparagine cannot be employed as nitrogenous nutriment or built up by these two Saccharomycetes. If we confront this result with that obtained by G. Lockemann[1]), the above conclusion will be borne out, because we shall then find that whereas neither

[1]) l. c.

Saccharomyces Carlsbergensis nor Saccharomyces apiculatus is able to act upon the asparagine molecule, the Tubercle Bacillus is able to do so.

Seeing that neither of the two Saccharomycetes in question brings about any nitrogen assimilation — no nitrogen can be estimated quantitatively in the yeast-cells collected and washed —, it was an obvious conclusion that the organisms sown in the nutrient liquid might have died without having acted upon the substances existing in the nutrient liquid and without having done any work at all. This, however, was far from being the case, Saccharomyces Carlsbergensis having on the contrary multiplied very appreciably, at least in the first 24 days. After the expiration of this time a pretty considerable layer of yeast sediment had formed, which was colourless and could be easily shaken up. On continued standing no further increase of the yeast could be observed. Saccharomyces apiculatus also showed a vegetative propagation — though only a very inconsiderable one — in the first 24 days. Under the microscope the appearance of the new-formed cells was quite normal, though the cell contents were markedly granulated, probably a sign of inanition or starving. Furthermore, we find that the nutrient liquid does not give off quantitatively demonstrable quanties of nitrogen to the new-formed cells — see Table L, column (N). We are therefore forced upon the conclusion that the new-formed cells contain a practically nitrogen-free protoplasm, or, to put it more exactly, that the total amount of nitrogen of new-formed cells does not exceed the total quantity of nitrogen contained in the sum of the cells sown in the nutrient liquid; it is to be noted, however, that this amount is so small that it cannot be estimated by Kjeldahl's method. I have not been able to establish any falling off in the total nitrogen contents of the nutrient liquid; neither have I been able to quantitatively assign nitrogen in the new-formed cells according to Kjeldahl. I therefore believe we shall be justified in maintaining that vegetative propagation is possible, at least as regards the Saccharomycetes under consideration — and more particularly Saccharomyces Carlsbergensis —, even though the experimental liquid does not contain any such nitrogenous matters as can be utilised by the organisms in the service of nutrition.

It is not only with regard to the vegetative reproduction that a very noticeable effect is found to be exerted, although no nitrogen assimilation can be observed. Thus, on looking through the column (Alk) in Table L, we shall find that Saccharomyces Carlsbergensis is able to form a slight quantity of alcohol. After 13 days' fermentation this yeast had formed a trace of alcohol[1]). At the end of 24 days 10,000 cc. of experimental liquid had produced 15 gr., and after 32 days 21 gr. of alcohol. Saccharomyces apiculatus, on the contrary, could not be shown to have formed the slightest trace of alcohol. In the case of Saccharomyces Carlsbergensis, the alcohol formation is probably attributable to the yeast-cells sown, and it is accordingly to be assumed that the new-formed cells do not contain zymase at all[2]). As this enzyme decidedly contains nitrogen, it follows that this result agrees perfectly with what has been said above.

The column (I) in Table LI constantly shows a negative consumption of extract, which of course implies an increase of the extract amount. This may seem strange, but is evidently due to the circumstance that greater and greater quantities of saccharose are inverted in the progress of the experiment. According to the inversion process — $C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O = 2C_6H_{12}O_6$ — we can approximately calculate, how many gr. of saccharose have been inverted within the different experimental periods. We thus arrive at the following figures: —

	Fermented in days	Inverted gr. of saccharose in 10,000 cc. of experimental liquid
Saccharomyces Carlsbergensis	6	about 38 gr.
	13	» 76 »
	24	» 361 »
	32	» 456 »
Saccharomyces apiculatus	6	» 38 »
	13	» 133 »
	24	» 266 »
	32	» 361 »

[1]) This trace was detected by means of Pasteur's drop reaction, as modified by A. Klöcker, and also with the help of the iodoform test. Compt. rend. des travaux du Laborat. de Carlsb. **10**, 99 (1911).

[2]) This result seems to coïncide with, and thus to bear out, the correctness of the observations made by Hans Pringsheim. Ber. d. d. chem. Ges. **39**, 4048 (1906), and Bioch. Zeitschr. **3**, 121 (1907).

Also by qualitatively following the inversion process, I found the quantity of saccharose to diminish gradually to such a degree that after 32 days' fermentation by Saccharomyces Carlsbergensis — if a fermentation can be said to have taken place at all — only a relatively small proportion of this carbohydrate was left in the experimental liquid. As even minute quantities of invertase are able to transform considerable quantities of saccharose, this action may perhaps be attributed entirely to the invertase contained in the cells sown. It appears, however, that this explanation does not hold good of Saccharomyces apiculatus. We have before seen that this organism is unable to ferment saccharose, and consequently it does not contain invertase, but nevertheless we meet with an almost as strong inversion in this case as in that of Saccharomyces Carlsbergensis. It therefore appears to be more adequate to consider this conversion of saccharose into reducing carbohydrates as the proper effect exerted by the nutrient liquid in the course of time. Accordingly, in the case before us we are not able to obtain any information whatever about the question as to whether the new-formed cells contain any invertase or not; but it appears to be the most probable that they do not contain any enzyme.

With regard to the changes undergone by the figures representing mineral constituents and acidity, they are rather too fluctuating to warrant any safe conclusion.

Finally it is worthy of remark that the hydrogen ion concentration increases quite normally, at least in the case of Saccharomyces Carlsbergensis.

(b) Secondary Fermentation.

The two experiments recorded in Table LII act as supplement to each other in regard to the duration of storing, the influence of that duration upon the composition of the beer having been followed in Experiment I from 0 to 120 days' storage under normal conditions at a temperature of 2^0, and in Experiment II from 143 to 321 days. As, however, the two experiments were not made with the some samples of beer, we cannot, of course, continue from one experiment into the other; on the other hand, we may safely draw decisive conclusions by comparing what, and how great, changes have taken place in the two experimental periods.

TABLE LII.

Column marks		A			B	C	A_I	A_{II}	D	E	F	G	H	N	$A_I + A_{II}$	P	T	P+T	O	
		10,000 cc. of experimental liquor contains																		
							gr. of nitrogen in the form of													
							Albumin		peptic cleavage products = P			tryptic cleavage prod. = T				Cleavage products				
Experiment No	Stored at 2° for — days	gr. of extract	gr. of alcohol	gr. of extract in the standard wort (calculated)[1]	gr. of ash	Acid ∽ cc. of normal NaOH	I	II	Denuc-lein	Proteose	Peptone	Ammo-nia	Amine-Amid	total nitrogen	Albumin I and II	peptic	tryptic	proteo-lytic	peptid bindings	PH
I	0	568	389	1329	20.0	240	0.42	0.28	0.77	0.42	0.28	0	3.71	5.88	0.70	1.47	3.71	5.18	1.54	4.4
	27	513	422	1338	—	—	0.49	0.28	0.70	0.28	0.42	0	3.71	5.88	0.77	1.40	3.71	5.11	1.61	4.3
	38	513	421	1336	19.0	250	0.42	0.21	0.77	0.42	0.35	0	3.71	5.88	0.63	1.54	3.71	5.25	1.61	4.4
	91	500	425	1331	20.0	210	0.42	0.21	0.77	0.35	0.42	0	3.71	5.88	0.63	1.54	3.71	5.25	1.68	4.5
	120	495	431	1338	18.8	235	0.42	0.28	0.63	0.35	0.49	0	3.71	5.88	0.70	1.47	3.71	5.18	1.82	4.6
II	143	—	—	—	22.3	340	0.42	0.14	0.77	0.49	0.35	3.36		5.53	0.56	1.61	3.36	4.97	—	—
	179	—	—	—	22.0	310	0.35	0.14	0.77	0.49	0.49	3.29		5.53	0.49	1.75	3.29	5.04	—	—
	208	—	—	—	22.0	255	0.35	0.21	0.70	0.49	0.49	3.36		5.60	0.56	1.68	3.36	5.04	—	—
	236	—	—	—	22.0	230	0.35	0.21	0.70	0.49	0.49	3.36		5.60	0.56	1.68	3.36	5.04	—	—
	300	—	—	—	—	280	0.28	0.28	0.70	0.49	0.49	3.29		5.53	0.56	1.68	3.29	4.97	—	
	321	—	—	—	21.9	230	0.42	0.21	0.70	0 35	0.49	3.43		5.60	0.63	1.54	3.43	4.97	—	—
Analytical errors		2.0			0.6	4.0	0.12					0.07		0.07					0.11	0.1

[1]) gr. of alcohol × 1.956 + gr. of extract = gr. of extract in the standard wort.

It is a well known fact — and one which is borne out by column (A) and by the alcohol figures arrived at — that during Secondary Fermentation a continued, but not very pronounced fermentation takes place. This fermentation, which is greatest in the first 30 days, decreases gradually. We also find that the acidity increases a little during the first 40 days' storage, after which time it is seen to fluctuate, apparently a consequence of an esterification, which manifests itself in the titration with $^1/_{10}$ normal sodium hydroxide and phenolphtalenie. A constant turning point is not arrived at until larger quantities of $^1/_{10}$ normal caustic soda have been added than those corresponding to the figures given in the table, which are calculated from the turning point obtained after two minutes' standing.

The hydrogen ion concentration increases a little during the first 30 days' storage, but then decreases little by little in process of time.

Making due allowance for the analytical error, the four columns of figures (N), (P + T), (T) and (G) are found to keep constant throughout the two experimental periods. From this fact we may infer that the values of the processes of coagulation, assimilation, condensation, decomposition and ammonia liberation are = 0, even though the storage lasts for so long a time as 321 days. At the same time, however, the amount of nitrogen as peptid linked increases a little with the storage, a fact which indisputably goes to prove that, notwithstanding what has been said above, some change takes place with regard to the character of the nitrogenous organic compounds. This can hardly be accounted for in any other way than by assuming that the amount of nitrogen required for the new-formation of yeast-cells which has proved to take place is procured by dead yeast-cells, so that there occurs a state of equilibrium between consumed (assimilated) nitrogen and nitrogen given off by dead cells. It is evident that the number of peptid-linked nitrogen atoms may in this way be changed both in the positive and negative direction; but the results show that, although there is an equilibrium between the quantity of nitrogen consumed and that of nitrogen given off, yet the dead yeast-cells must give off nitrogenous organic substances which contain a larger amount of peptid-

linked nitrogen than the nitrogenous matters consumed in the formation of new yeast-cells.

To sum up, it appears that the secondary fermentation exerts only a slight influence on the chemical composition of the beer.

The amounts of alcohol, esters and peptid-linked nitrogen increase a little during secondary fermentation.

5. Principal Results.

These may be summed up as follows: —

(1) The transformation of the proteïds chiefly takes place in the process of germination and increases very nearly in proportion to the duration of the latter. The most important effects in regard to the transformation of carbohydrates and mineral constituents occur during the mashing process, the optimum lying in the vicinity of 70°. See p. 286.

(2) If proteïd transformation (especially albumin conversion) during germination has not come to a close, the fault cannot be rectified in a following mashing. See p. 287.

(3) The speed or facility with which proteïd transformation in germinating barley is accomplished is by no means in an inverse ratio to the total nitrogen content of barley dry matter. See p. 288.

(4) The fitness of a barley for malting purposes depends not only on its vitality or behaviour in the steeping process, but also on the length of time it requires to bring the proteïd transformation to an end during germination. See p. 288.

(5) The concentration of hydrogen ions is unaffected by the steeping, germination and mashing processes in themselves. See p. 289.

(6) The measurements of the numerical values of the different proteïd transformation processes by my precipitation method, and of the extent of peptid splitting through a formol titration, act as supplements to one another, but cannot replace one another. The proteïd transformation processes mark the proteolysis down to the formation of the most complex amine-amide compounds, whilst the peptid splitting particularly marks the decomposition of the most complex into the less complex amine-amide compounds. See pp. 294, 295 and 304.

(7) The Mashing Factors.

A. Degree of Fineness of Malt Meal.

The yield of extract diminishes noticeably, and the amount of soluble nitrogenous matter very little, as the degree of fineness of malt meal becomes lower. The ratio of the amount of extract and that of soluble nitrogen do not undergo any appreciable change. See p. 297.

B. Concentration of Mash.

a) This factor exerts a marked influence upon the quantitative composition of the extract, since the maximum of the formation of extract transformation of carbohydrates) lies, approximately, at the concentration 1 part of malt + 6 parts of water, and of the formation of soluble nitrogenous compounds at 1 part of malt + 2 parts of water or there about. See p. 299.

b) The proteïd dissolution process decreases very nearly in a direct ratio to the concentration of the mash, whereas the albumin conversion process, peptic action and tryptic action decrease a little more. See p. 298.

c) The albumin conversion process is, among all the proteïd transformation processes, the one that is influenced to the greatest extent by the mash concentration. See pp. 298 and 299.

d) The faculty of clarification of the wort and the time in which it runs off decrease a little as the mash concentration decreases. See p. 299.

C. Mashing Temperature.

a) The tryptase has an optimum point (not an optimum zone) at least as sharply defined as that of the peptase. See p. 300.

(b) Not only the quantitative, but also the qualitative aspect of proteolysis is influenced by the mashing temperature. See pp. 302 and 304.

(c) The liberation of ammonia is not influenced by the mashing temperature; neither is the concentration of hydrogen ions affected by this factor itself. See p. 305.

(d) The action of peroxydases increases from 10° to 20°, but decreases as soon as the temperature exceeds 20°. At 38° the action has almost ceased. See p. 305.

e) The catalases exercise their maximum action at 10°, and only begin to be weakened at temperatures above 45°. See p. 305.

D. Duration of Initial Mashing.

(a) All the proteïd transformation processes nearly attain their maximum after 30 minutes' mashing at 45°. See p. 307.

(b) The right duration of initial mashing exerts a favourable influence on the various transformations taking place during the principal mashing, and more particularly on the albumin conversion process. See p. 308.

E. Duration of Boiling.

(a) The direct boiling of the mash may result in the albumin conversion process becoming reciprocal, whilst at the same time it necessarily favours the coagulation of the albumins. See p. 310.

(b) The direct boiling of the mash noticeably diminishes the faculty of clarification of the wort. See p. 310.

F. Elutriation of Husks.

The washing out of the husks with distilled water at the ordinary temperature does not exert any material influence upon the composition, per cent, of the extract. The washing out of peptic and tryptic decomposition products manifestly goes off quicker than that of the other extractive matters. See p. 312.

G. The Salt Effect.

(a) The salt amount itself (the direct salt effect) influences but very little the different transformation processes. Only the carbohydrate transformation, the albumin conversion, and perhaps also the peptic action are influenced (furthered) by this factor. Where the maximum lies, cannot be inferred. See p. 318.

(b) The hydrogen ion concentration is apt to influence the transformation of carbohydrates and all the proteïd transformation processes, excepting the liberation of ammonia. The influence rises and falls as the hydrogen ion concentration rises or falls; quantitatively it is pretty considerable, and it is always greater in regard to the peptic than to the tryptic action. The maximum effect requires a hydrogen ion concentration superior to $0.122 \times 10^{\div 5}$, and the minimum effect a concentration inferior to $0.122 \times 10^{\div 6}$. See pp. 319—320.

(c) Only the transformation of carbohydrates and the conversion of albumin II into albumin I are influenced by the acidity, and are changed in the same direction. The quantitative influence of the acidity is, however, not very great. See p. 321.

d) Equivalent quantities of different anions exert exactly the

same effect upon all the proteid transformation processes, whereas a slight difference is perceptible in their power of reaction towards the carbohydrate transformation. In the latter case the sulphate ion acts a little more vigorously than the chlorine ion, whether the effect be positive or negative. See p. 321.

(e) Equivalent quantities of different kations exert very nearly the same effect upon the carbohydrate transformation and also upon the various proteïd transformation processes. See p. 322.

(f) The anions exert a favourable, the kations a restraining influence upon the transformations going on during mashing. Equivalent quantities of different anions and different kations neutralise each other in regard to their action upon the various transformations. See p. 323.

(g) The liberation of ammonia is in no case influenced by the salts present in the mashing water. Neither is the peptid splitting influenced in any noticeable degree. See p. 325.

(h) The various transformation and decomposition processes of carbohydrates and proteïd substances are influenced during mashing in three different ways by the salts existing in the mashing water, namely: by the change of hydrogen ion concentration or of acidity, and by the amount of salt. The greatest influence on the course of the transformations is exerted by the hydrogen ion concentration, and the least influence by the salt amount. If the hydrogen ion concentration, the acidity or the salt amount is augmented (as a matter of course not beyond a certain point), the various transformation processes are promoted to a greater or less degree, whereas they are checked if the numerical values of these three factors are diminished one by one or simultaneously. See pp. 326 and 327.

(i) It is chiefly the action of the various salts upon the phosphates present in the malt which produces the changes in the hydrogen ion concentration. See p. 324.

(8) The Wort Boiling Factors.

A. Duration of Boiling.

(a) The acidity is not affected by a short boiling (2 hours); but if the boiling is prolonged, it is seen to increase. The increase is about the same whether hops have been added or not. See p. 334.

(b) The hydrogen ion concentration increases as the boiling progresses. See p. 334.

(c) The faculty of clarification of the wort is at its optimum after 3—4 hours' boiling. See p. 334.

(d) A comparatively small amount of albumin II may be converted into albumin I, whereas albumin II is not coagulated to any noticeable degree during the boiling of the wort. See p. 337.

(e) A greater or less quantity of albumin I can be coagulated, and at the same time a smaller or greater proportion of the same proteïd is susceptible of being broken down to peptic decomposition products. The coagulation of albumin I reaches its maximum after 4 hours' boiling, and the coagulate is not re-dissolved on continued boiling. See p. 337.

(f) Both the tryptic cleavage and the liberation of ammonia increase more or less as the boiling progresses. See p. 337.

(g) The extent of coagulation is found to considerably influence both the peptic and tryptic demolition processes, whilst it does not appear to affect the ammonia liberation process. When albumin I shows a great faculty of being coagulated, peptic cleavage may entirely fail to appear, — and conversely if albumin I has only a slight faculty of coagulation. See pp. 337 and 338.

(h) The amount of peptic decomposition products almost always decreases, the tryptic cleavage being generally more intense during wort boiling than the peptic. See p. 338.

(i) The hops are found to precipitate smaller or larger quantities of peptic cleavage products, and to promote the coagulation, the peptic cleavage and perhaps the albumin conversion, whereas the tryptic decomposition is relatively weakened and the ammonia liberation process not affected at all. The maximum effect for the coagulation and precipitation processes is attained after 4 hours' boiling, which if prolonged will render at least the latter process reciprocal. See p. 339.

(k) The quantitative action which the boiling of wort with hops exerts upon the proteïd matters in the wort depends very greatly upon the quality of the malt from which the wort was prepared. See p. 339.

(l) The coagulation of albumin II, as well as the conversion of albumin II into albumin I, are quantitatively quite insignificant in wort boiling with or without hops. See p. 340.

B. The Proportion of Hops.

(α) The specific effect of the hops.

a) The hops increase the hydrogen ion concentration of the wort, as also the amount of extractive matters, ash and acids contained in it. See p. 340.

b) The faculty of clarification of the wort decreases according as the quantity of hops is increased. See p. 340.

c) The total amount of nitrogen in the wort, as well as the amount of nitrogen in the form of peptic cleavage products, decrease during boiling with very small quantities of hops. If the hop quantity is augmented, the amount of nitrogen in the two above mentioned forms will again begin to rise. The equilibrium lies at about 2 gr. of hops added to 300 cc. of unhopped wort, at least with regard to the total nitrogen amount in the wort. The amount of tryptic decomposition products increases very nearly proportionally to the hop quantity added. Only very small quantities of hops are required to precipitate all that can be precipitated of albumin I, whereas albumin II cannot be precipitated at all without the addition of a rather considerable hop quantity. See pp. 340 and 342.

(β) Effect of the Hops upon the Substances existing in the Wort itself.

a) The wort gives off extractive matters to the hops, just as the hops give off such matter to the wort; but the former process has always a slightly higher numerical value than the latter. See p. 344.

b) The hops do not affect the mineral matters or acidity of the wort beyond the sum of ash and acid (or acid compounds) given off by the hops to the boiling wort. See p. 344.

c) The larger the amount of hops added to the boiling wort, the more will the coagulation, precipitation (of peptic cleavage products) and peptic cleavage be promoted; but at the same time the albumin conversion and tryptic cleavage will be impaired in proportion. The ammonia liberation process, on the contrary, remains entirely unaffected by the hops. See p. 345.

C. The Temperature or Pressure.

a) The change undergone by the extract amount of the wort depends, in the main at least, on the way in which the coagulation and precipitation processes go off. See p. 347.

(b) The temperature at which the boiling is effected does not play any part with regard to the ash content of the wort; whereas the acidity and hydrogen ion concentration increase as the boiling temperature rises. See pp. 345 and 347.

(c) When the wort is boiled with hops, its faculty of clarification diminishes as the temperature rises; but the colour is intensified. See p. 347.

(d) The coagulation of the albumins (I and II) increases with the boiling temperature or the pressure at which the boiling takes place. In the case of albumin II, however, the maximum effect is produced by a pressure of one atmosphere. See p. 349.

(e) Albumin conversion occurs only when the wort is boiled at a temperature not exceeding 101°. The maximum effect lies perhaps already at 78° or there about. This transformation fails entirely to appear when the boiling takes place at 109°, that is, under a pressure higher than one atmosphere. See p. 349.

(f) The peptic and tryptic decompositions increase with the boiling temperature. The maximum, however, is at 101°; if the temperature is raised above 101°, either of these two processes decreases; this applies more particularly to the peptic decomposition. See p. 349.

(g) The liberation of ammonia increases a little with the boiling temperature (pressure). See p. 350.

(h) The action of hops upon the proteïd matters existing in the wort is greatest at a pressure of one atmosphere (101°), at any rate as far as the coagulation, precipitation and peptic cleavage are concerned. Only the tryptic cleavage and ammonia liberation continue increasing when the temperature exceeds 101°. See p. 350.

D. Wort concentration.

(a) The percentage of mineral matters and acid contained in the extract does not change during boiling, even if the wort concentration is varied. See p. 351.

(b) The albumin conversion and the peptic cleavage increase during boiling without hops when the concentration of the wort decreases, whereas the coagulation of albumin II, the tryptic cleavage and ammonia liberation remain unaffected. See pp. 351 and 353.

(c) The clarifying faculty of the wort is increased by boiling with hops when the concentration of the wort decreases. See p. 351.

(d) The wort concentration does not play any part with regard to the amount of nitrogen removed from the wort during hop boiling. See p. 355.

(e) All established facts go to show that both the coagulation of albumin II and the conversion of albumin II into albumin I decrease during hop boiling when the wort concentration is going down. See p. 355.

(f) In the course of the hop boiling the numerical value of the precipitation of peptic cleavage products increases in proportion to the value of peptic cleavage according as the wort concentration diminishes. Neither the tryptic cleavage nor the ammonia liberation is affected by this factor. See p. 355.

E. The Action of Oxygen during Boiling.

(a) The ash amount diminishes a little as oxygen tension increases, whereas acidity and hydrogen ion concentration remain unaffected. See pp. 355 and 357.

(b) The faculty of clarification of the wort is promoted by the action of oxygen. See p. 357.

(c) The oxygen tends to promote coagulation and precipitation of peptic cleavage products by the hop-tannin bodies), and to check the peptic and tryptic decomposition processes, whilst it does not act upon the ammonia liberation process. See p. 359.

F. The Sort of Hops.

(a) The proteïd matters contained in the wort are influenced a little differently during boiling with different sorts of hops. See pp. 361 and 363.

b) Some sorts of hops promote more than others the coagulation of albumins and precipitation of peptic cleavage products, whilst at the same time weakening the peptic and tryptic decomposition processes. See p. 361.

(c) The extractive matters, mineral constituents, acidity and hydrogen ion concentration of the wort are influenced alike by the different hops examined. Ammonia liberation is not affected by the sort of hops at all. See pp. 361 and 363.

d) The direct influence of the different sorts of hops upon the chemical composition of the wort is very nearly the same. See p. 363.

(9) Primary Fermentation.

(a) The transformation undergone by the nitrogenous organic

substances during fermentation is determined by the following processes: —

Coagulation, by which greater or less quantities of albumins I and II are precipitated.

Condensation, in which tryptic decomposition products result in peptic ones (tryptic condensation), which in their turn give real albumins (peptic condensation).

Cleavage, partly of a peptic and partly of a tryptic nature.

Ammonia liberation, in which ammonia is separated from amine-amid compounds.

Assimilation, in which ammonia contained in the cell produces nitrogenous organic compounds.

Peptid splitting, consisting in one or more peptid bindings being split up in the molecules of the nitrogenous organic compounds present. See pp. 365 and 366.

(b) The results relate to experiments made with the following five organisms: — Saccharomyces Carlsbergensis, Saccharomyces Pastorianus I, Saccharomyces apiculatus, Torula B (Brettanomyces) and Monilia candida.

(c) The vitality of the organisms is impaired or perhaps even altogether destroyed when the hydrogen ion concentration exceeds 0.357×10^{-4}. See p. 370.

(d) The hydrogen ion concentration increases in the course of the primary fermentation (see p. 370), but diminishes somewhat in a sufficiently prolonged secondary fermentation. See p. 386.

(e) A small proportion of the mineral matters of the nutrient liquid is, of course, consumed in the new-formation of cells. See p. 371.

(f) The acidity increases as fermentation progresses; the different organisms, however, are far from having the same tendency to form acids or acid compounds. See p. 371.

(g) The vital powers of the organisms experimented with are very different. See p. 375.

(h) The oxygen of the air favours the vegetative propagation of the aërobian organisms, and impairs the vital or chemical power of the cell. The oxygen also tends to promote all the proteïd transformation processes, though not always in the same measure as it promotes vegetation propagation. See pp. 375 and 379.

(i) My experiments go to prove, in a certain measure, the correctness of Pasteur's fermentation theory. See p. 375.

(j) The greatest transformations within the group of nitrogenous matters occur during primary fermentation. See p. 378.

(k) The organisms considered act very differently — both quantitatively and qualitatively — upon the nitrogenous organic compounds contained in the nutrient liquid, which probably means that different organisms are able to split different bindings in the molecules of those compounds. See pp. 378 and 380.

(l) Vegetative propagation may take place even if the nutrient liquid does not contain any such nitrogenous substances as can be used by the organism in question in the service of nutrition. See p. 382.

(m) In the latter case the new-formed cells contain a protoplasm which is practically free from nitrogen (see p. 382). The new-formed cells are incapable of inducing alcoholic fermentation; they do not contain zymase. See p. 383.

(10) Secondary Fermentation.

(a) The influence exerted by secondary fermentation upon the chemical composition of the beer is very inconsiderable.

(b) The amount of alcohol and the acidity increase a little in the beginning. Later on, there occurs a noticeable formation of esters. See pp. 386 and 387.

(c) The amount of peptid-bound nitrogen increases a little. See p. 387.

October 1912.

CORRECTION

TO MY PAPER IN THE COMPT. REND. DES TRAVAUX DU LABORAT. DE CARLSB. **8**, 154 (1910):

P. 390, line 10 f. t. twenty-four is to be corrected to "forty-eight".

COMPTES-RENDUS

DES TRAVAUX

DU

LABORATOIRE DE CARLSBERG

10ME VOLUME.

ÉDITION FRANÇAISE.

1911—1913.

COPENHAGUE

EN COMMISSION CHEZ H. HAGERUP

IMPRIMERIE DE THIELE

1913

TABLE DES MATIÈRES DU TOME DIXIÈME.

Première livraison, 1911.

J. C. JACOBSEN. A l'occasion de son centenaire. Par C. NYROP <1>—<23>

Sur la coagulation des substances protéiques par chauffage. Par S. P. L. SØRENSEN et E. JURGENSEN 1

I. La concentration en ions hydrogène du milieu subit-elle des modifications par suite de la coagulation? 1

A. Les conditions optimales de coagulation 6

B. Modification subie par la concentration ionique lors de la coagulation 12

C. Influence de la durée de coagulation 41

Quelques remarques sur le titrage iodométrique d'acides et sur la méthode Kjeldahl pour le dosage de l'azote. Par R. KOEFOED 52

Détermination électrométrique de la réaction des liquides renfermant de l'acide carbonique. Par K. A. HASSELBALCH 69

Sur le mesurage et la grandeur de la concentration en ions hydrogène de l'eau salée. Par SVEN PALITZSCH 85

A. Aperçu historique 85

B. Mesures de la concentration en ions hydrogène de l'eau de mer effectuées au cours de la croisière du vapeur «Thor» 89

C. Détails relatifs à l'exécution pratique du mesurage de la concentration en ions hydrogène de l'eau de mer 94

Méthode pour reconnaître la présence de petites quantités d'alcool dans des liquides en fermentation et quelques résultats qu'elle a permis d'obtenir. Par ALB. KLÖCKER 99

Etudes sur la synthèse des acides aminés. IX. L'arginine racémique (acide-α-amino-δ-guanido-n-valérique) et son isomère, acide-α guanido-δ-amino-n-valérique. Par S. P. L. SØRENSEN, MARGRETHE HØYRUP et A. C. ANDERSEN 114

Partie expérimentale 121

A. Les deux ornithines monobenzoylées et leurs dérivés oxy-et guanidiques . 121

1. α monobenzoylornithine 121

2. Désamination de l'α-monobenzoylornithine 124

3. Acide α-monobenzoylamino-δ guanido-n-valérique (Monobenzoylarginine racémique synthétique) 129

4. Nitrate d'arginine synthétique racémique 132

5. Nitrate cuivrique d'arginine synthétique racémique 133

6. Picrate d'arginine synthétique racémique 135

7. δ-mononbenzoylornithine 137

8. Désamination de la δ-monobenzoylornithine 139

9. Acide α-guanido δ-monobenzoylamino-n-valérique 147

10. Sel chlorhydrique de l'anhydride α-guanido-δ-amino-n-valérique 152

B. Dérivés de l'acide γ-cyanamidopropyle-phtalimido-malonique 155
11. Éther γ-cyanamidopropyle-phtalimidomalonique 155
12. Éther γ-cyanamidopropyle-phtalimidomalonamidique 157
13. Acide γ-cyanamidopropyle-phtalimidomalonamidique 159
14. Acide γ-cyanamidopropyle-phtalimidomalonique 160
Sur l'emploi du rouge de méthyle au mesurage colorimétrique de la concentration en ions hydrogène. Par SVEN PALITZSCH 162
Études sur la farine de froment. Par H. JESSEN-HANSEN 170
Introduction 170
A. Méthodes expérimentales 172
1. Manière d'effectuer les essais de cuisson 173
2. Détermination de la concentration en ions hydrogène 176
B. Résultats expérimentaux 179
C. Conclusions 190
1. Sur la conservation de la farine 190
2. Moyens «artificiels» d'améliorer la farine 194
3. Concentration des ions hydrogéne des divers produits de mouture 199
4. Extraction de gluten utilisée comme méthode analytique 201
Résumé 204

Deuxième livraison, 1913.

Recherches sur les organismes de fermentation. Par ALB. KLÖCKER.
I. Recherches sur quelques nouvelles espèces de Pichia, et remarques relatives aux descriptions spécifiques des Saccharomycètes en général 207
Sur l'emploi de l'extrait de choux rouge comme indicateur dans la mesure colorimétrique de la concentration des ions hydrogène. Par L. E. WALBUM 227
Investigations on hops (Humulus lupulus, L). By JOHS. SCHMIDT 233
I. The growth in length of hop-stems and its diurnal periodicity. By Johs. Schmidt 235
1. Introduction 235
2. The observations 235
3. On what is the rate of growth dependent? 236
A. Preliminary investigations 236
B. Investigations in 1911 243
C. Investigations in 1912 245
4. Résumé 248
Sur «l'erreur de sel» dans la mesure colorimétrique de la concentration des ions hydrogène de l'eau de mer. Par S. P. L. SØRENSEN et PALITZCH .. 252

Troisième livraison, 1913.

Méthode pour doser de petites quantités de mercure présentes dans les matières organiques. Par SVEND LOMHOLT et J. A. CHRISTIANSEN 259
Investigations on hops (Humulus lupulus, L.). By JOHS. SCHMIDT 267
II. The rotational movement of hop-stems and its diurnal periodicity. By Johs. Schmidt 267
1. Introduction 267
2. Method of observations 268

3. On what does the rate of rotation depend? 269
A. Investigations under natural conditions 270
B. Investigations under artificial conditions 275
C. Correlation between the rate of rotation and the active quantities of heat 279
D. Comparative experiments with other twining plants 280
4. Résumé 282

Quatrième livraison, 1913.

Recherches sur les organismes de fermentation par ALB. KLÖCKER 285
II. Recherches sur 17 formes du «Saccharomyces apiculatus» 285
I. Résumé des recherches antérieurement faites sur les caractères propres à la classification du «sacch. apiculatus» 285
II. Mes nouvelles recherches 290
1. Expériences relatives à des espèces ne formant pas de spores 290
A. Recherches physiologiques et morphologiques 290
a. Espèces renfermant de l'invertine 290
b. Espèces ne renfermant pas d'invertine 314
B. Classification 319
2. Formes sporogènes 335
Liste bibliographique 343
Explication des figures 347
Monuments érigés à la mémoire de Joh. Kjeldahl et Emil Chr. Hansen <25>—<29>

J. C. Jacobsen

J. C. JACOBSEN.

A L'OCCASION DE SON CENTENAIRE.

1811 — 2 SEPTEMBRE — 1911.

PAR

C. NYROP.

De temps immémorial, la corporation des brasseurs de Copenhague jouissait du privilège de faire la bière nécessaire à la consommation de la ville. Ce privilège était attaché à un certain nombre d'immeubles renfermant des locaux servant à la fabrication de la bière et dont les propriétaires constituaient la corporation. Mais comme on n'exigeait pas d'eux qu'ils fussent brasseurs de profession, il s'en trouva parmi eux un bon nombre qui ne l'était pas, voire même des prêtres et des amiraux. Il s'en suivait qu'ils étaient obligés de confier la direction du travail à des employés. C'est ainsi que de simples garçons brasseurs qui n'avaient pas beaucoup d'instruction, en vinrent à prendre de l'importance, et comme, à un moment donné, selon le bon vieil usage admis dans les corporations, on avait introduit un arrangement par lequel chaque brasserie était tenue de brasser à tour de rôle la même quantité de bière, la fabrication de la bière tomba tout naturellement en décadence. L'émulation résultant de la concurrence fut ainsi mise hors de jeu. Les bourgeois de Copenhague commencèrent à se plaindre; les plaintes se firent de plus en plus pressantes, si bien que, finalement, en 1805, la corporation fut abolie, le privilège des brasseries retiré et les propriétaires indemnisés en espèces.

Le brassage de la bière pouvait maintenant se faire librement, mais on ne remarqua aucun changement quant à la bière. Les plaintes continuaient. Pendant de longues années encore, on eut égard aux habitudes prises par les anciennes brasseries de la ville, et les garçons brasseurs en gardèrent la direction. Les

plaintes portaient entre autres sur le fait que, guidés uniquement par la routine, ils faisaient la bière sans avoir la moindre connaissance théorique des divers procès que comporte la fabrication de la bière, ce qui était exact en grande partie. Toutefois, si un grand nombre de ces garçons brasseurs étaient stupides et ignorants, ils ne l'étaient pas tous. Il y avait d'honorables exceptions, parmi lesquelles nous comptons l'homme qui devint le fondateur de la célèbre lignée universellement connue des brasseurs danois Jacobsen, l'homme qui fut le père de celui qui vint au monde il y a aujourd'hui cent ans, — anniversaire que nous célébrons en ce jour.

Christen Jacobsen vit le jour le 15 mars 1773 dans la ferme Norkjær dépendant de Gjettrup et située dans la partie du nord du Jutland appelée Vendsyssel. Ses parents étaient de braves paysans craignant Dieu, et il grandit en les aidant dans les différents travaux de la ferme. Il resta auprès d'eux aussi longtemps qu'ils vécurent; mais en 1800, l'année qui suivit la mort de son père — il avait déjà perdu sa mère —, il partit pour Copenhague, où nous le trouvons comme valet dans l'établissement appelé «Brasserie du Roi», exploité par la corporation des brasseurs de Copenhague. C'est sans doute là que l'idée de devenir brasseur lui est venue. Ce qui est certain, c'est que, quelques années plus tard, il était ouvrier brasseur dans une autre brasserie de Copenhague, qu'il afferma en 1811. Avec l'esprit d'économie qui caractérise les Jutlandais, il avait vraisemblablement su mettre quelque chose de côté, si bien que, malgré les temps durs qui à cette époque pesaient lourdement sur le Danemark, il était parvenu petit à petit à une aisance relative. Il en donna la preuve lorsque, en 1826, il acheta une des anciennes brasseries de Copenhague (située dans la Brolæggerstræde), qu'il agrandit sitôt après.

Il était arrivé dans la capitale comme un simple campagnard; mais il était loin d'être un paysan ordinaire. Il avait l'esprit ouvert et éprouvait un vif besoin de s'instruire. Il ne se contenta pas d'avoir appris le côté pratique du métier de brasseur, mais il voulut aussi approfondir la longue suite de procès qui appartiennent à la fabrication de la bière et les phénomènes si variés qui s'y passent. Il se mit à étudier quelque peu la physique

et la chimie, et nous pouvons ajouter que, d'un autre côté, il ne laissait pas que de s'intéresser vivement aux questions religieuses et esthétiques. Il était naturellement porté à s'enthousiasmer pour tout ce qui est grand et noble On peut comprendre par là comment il se fit qu'on ne tarda pas à en parler comme étant un des brasseurs les plus capables de cette époque, ainsi que le dit le célèbre physicien danois H. C. Örsted dans la préface d'un livre que C. A. Bröndum fit paraître en 1828 sur les «Principes de la fabrication de la bière». Christen Jacobsen peut certainement être regardé comme ayant été le premier brasseur au Danemark qui ait fait de la bière, le thermomètre en main. C'est par là qu'il a marqué sa place dans l'histoire de la brasserie danoise; mais, comme initiateur dans ce domaine, il devait être sensiblement dépassé par son fils. Tandis que Christen Jacobsen a été peut-être le meilleur brasseur de son temps dans notre pays, celui qui faisait le mieux la bière à fermentation haute, dite bière blanche, seule en usage à cette époque, il était réservé à son fils, le deuxième brasseur Jacobsen, de réformer entièrement la fabrication de la bière au Danemark et de prendre place dans les rangs des brasseurs connus du monde entier.

JACOB CHRISTIAN JACOBSEN naquit à Copenhague le 2 septembre 1811; d'après ce que nous savons de son père, ce fut tout naturellement de bonne heure que, non seulement il l'initia à fond aux détails du métier de brasseur, mais qu'il lui fit aussi comprendre l'importance qu'ont pour cette industrie les connaissances théoriques. J. C. Jacobsen suivit les cours qui se donnaient à l'Ecole polytechnique récemment fondée, entre autres ceux donnés par H. C. Örsted, et il ne tarda pas à recevoir une forte impression de ce que les sciences naturelles pouvaient et devaient être pour les diverses branches de l'industrie. A ces études il joignit, dans la mesure du possible, principalement celle des mathématiques, de l'histoire ancienne et de la littérature allemande; il possédait en outre un sens artistique naturel très prononcé. Et voilà pourquoi, lorsque, en 1834, il eut l'occasion de se rencontrer avec des étudiants de son âge, il se trouva à leur niveau sur bien des points. Mais ses études ne furent pas

de longue durée. Il vint à remplacer son père quand celui-ci, dont les forces s'étaient mises à décliner, dut renoncer à s'occuper de la brasserie, et, après la mort de son père, qui survint quelques années plus tard, le 13 février 1835, il ne put les reprendre; il se consacra entièrement à l'exploitation de la brasserie pour le compte de sa mère.

A cette époque, il n'avait pas encore 24 ans. Malgré son jeune âge, il s'était déjà rendu compte qu 'il y avait quelque chose à réformer dans la manière dont on faisait la bière au Danemark, et lorsque, en 1836, il eut pour la première fois l'occasion de goûter de la bière de Bavière qui se débitait comme une rarete chez un marchand de vins de Copenhague, il comprit bien vite dans quelle direction la réforme devait porter. Dans ce but, il se rendit à Hambourg et, à son retour, il essaya, sans toutefois y réussir, de faire de la bière de Bavière dans la chaudière à lessive de sa mère; finalement il partit pour Munich, où il étudia la fabrication de la bière dans la célèbre brasserie Sedlmayr »Zum Spaten«, puis, rentré à Copenhague, il essaya de transformer sa levure de bière blanche danoise en levure à fermentation basse. — Pendant les années suivantes il fit essais sur essais, mais sans obtenir jamais de résultats satisfaisants. La vraie levure lui manquait, et il lui manquait aussi des caves de garde. Il pouvait bien chercher la levure à Munich, mais comment pourrait-il la conserver fraîche pendant le voyage long et difficile qu'était à cette époque-là celui de Munich à Copenhague? Il se rendit lui-même à Munich, se fit faire une boîte en fer-blanc pouvant contenir environ deux livres de levure et, au retour, partout où la diligence s'arrêta, que ce fût de jour ou de nuit, il eut toujours soin de faire couler de l'eau fraîche sur la boite pour en rafraichir le contenu. Grâce à ces soins, à son arrivée à Copenhague la levure était en bon état, et il put faire la bière; mais il ne réussit qu'à moitié à la garder en cave. La cave profonde qu'il avait découverte chez un charmand de vins étant bien insuffisante, il chercha à remédier à cet état de choses. Alors il advint, en 1844, qu'il eut à sa disposition un petit capital, et au mois de juin de cette même année, il obtenait sur

demande préalable, l'autorisation d'établir une petite cave sous les remparts qui entouraient Copenhague. La cave terminée, son but était atteint et, en mai 1846, on pouvait lire dans les journaux que la bière de M. Jacobsen provenant de la cave des remparts était à vendre dans divers débits de bière.

Mais qu'était-ce que d'avoir une brasserie primitivement aménagée dans la Brolæggerstræde et une toute petite cave sous les remparts? Cette cave ne pouvait contenir que 920 hectolitres. Pour que son exploitation pût avoir un avenir, une brasserie spécialement aménagée pour la fabrication de la bière de Bavière lui était absolument indispensable. Aussi ne tarda-t-il pas à faire les démarches nécessaires pour obtenir l'autorisation d'en construire une dans les environs de Copenhague et, l'ayant obtenue le 25 novembre 1846, il se mit, avec des capitaux empruntés, à construire sa nouvelle brasserie sur la hauteur de Valby, endroit qu'il avait choisi entre tous comme lui paraissant le mieux approprié. Il lui donna le nom de Carlsberg, du nom de son fils Carl, né en 1842 — le troisième de la lignée Jacobsen —, qui devait plus tard devenir célèbre et comme brasseur et comme Mécène; et, le 10 novembre 1847, il y procédait au premier brassage, qui réussit pleinement.

La brasserie si longtemps désirée était donc terminée; mais néanmoins la victoire n'était pas encore gagnée. L'eau que l'on avait cru avoir en abondance à cet endroit, ne s'y trouva pas en suffisance. Toute l'installation menaçait d'en être arrêtée; il fallut lutter énergiquement avant que la situation ne s'éclaircît à nouveau. Mais aussi la victoire fut-elle alors complète; l'exploitation prit coup sur coup un fort développement. L'installation avait été calculée sur la base d'une production annuelle de 6600 hectolitres; cette quantité fut presque déjà atteinte en 1849, et il fallut de nouveau songer à des agrandissements. De nouvelles constructions et de nouvelles caves s'ajoutèrent à celles existant déjà, mais bientôt après, leur insuffisance fut constatée; en 1856, la production annuelle de la brasserie atteignait le chiffre de 12300 hectolitres: Carlsberg était dans une situation florissante. Mais c'était pour ainsi dire malgré lui que Jacobsen se laissait

entrainer par ce developpement rapide: il avait plus à cœur de livrer bien que beaucoup.

Jacobsen envisageait son metier de brasseur comme une mission. La bière limpide bavaroise devait remplacer l'ancienne bière blanche si lourde, avec son cortège fatal de stimulants sous forme d'un ou de plusieurs petits verres. Selon lui, la bière de Bavière était un moyen efficace de remédier à la soif de l'eau-de-vie. Mais pour remplir sa mission, la bière devait être aussi bonne, aussi limpide et aussi vineuse que possible; elle devait avoir largement le temps de se faire et ne pas être livrée trop tôt, uniquement pour satisfaire aux demandes. Et il estimait en outre, que tout établissement industriel devait avoir des limites ne pouvant jamais être dépassées. Son but n'était pas du tout de faire fortune, ce qu'il a prouvé en réduisant à deux reprises le prix de la bière de Carlsberg en proportion de la réduction des frais de production obtenue par les améliorations techniques. C'est qu'en lui se trouvaient des aspirations ardentes vers un idéal qu'il s'efforçait sans cesse d'atteindre, et il le fait voir dans tous les domaines où il exerça son activité.

Il avait grandi au temps de l'opposition libérale qui s'éleva dans notre pays au siècle dernier contre le pouvoir absolu, et il se rallia de bonne heure à ce parti, ce que son père vit sûrement avec satisfaction. Lorsque, en 1831, il annonça à son père la prise de Varsovie par les Russes comme un évènement politique ordinaire, celui-ci le reprit avec véhémence de ce qu'il n'était pas plus profondément ému de la fin tragique d'un soulèvement héroïque contre la tyrannie. Jacobsen se joignit à ceux qui réclamaient une plus grande liberté pour les citoyens comme aussi une aide plus efficace à l'esprit danois si longtemps négligé dans le duché du Slesvig. Il était libéral et partisan de l'union des pays scandinaves, pénétré aussi du sentiment national qui commençait à s'éveiller dans le peuple danois, ce qui le fit nommer en 1843 membre du conseil municipal de Copenhague, où il prit bien vite une place importante. Comme travailleur acharné et capable, s'intéressant à toutes les questions techniques, il fut souvent mis à contribution; c'est ainsi qu'il fut au nombre de ceux qui dirigèrent

la construction de l'usine à gaz et l'installation des eaux que la ville de Copenhague finit par établir vers 1860. En outre, il prit une part active à la lutte que la municipalité de la capitale menait pour arriver à faire du Danemark un état constitutionnel.

La lutte devint aiguë lorsque, en janvier 1848, survint la mort du roi Christian VIII et que le pouvoir absolu passa à son fils Frederik VII. Jacobsen attendait beaucoup du mouvement, qui allait toujours croissant; aussi faisait-il partie de l'imposante manifestation populaire qui, le 21 mars 1848, partit en cortège de l'Hôtel de Ville, le Conseil municipal en tête, pour se rendre au château de Christiansborg, où le roi prêta une oreille favorable aux réclamations de son peuple.

Puis vint la guerre de trois ans (1848—1850), après laquelle le Danemark vainqueur possédait non seulement le duché danois du Slesvig, mais encore le duché du Holstein et, en plus, une constitution libérale que Frederik VII avait signée le 5 juin 1849. Le peuple danois tout entier fut dans la joie, mais les années qui suivirent n'en furent pas moins, au point de vue politique, remplies de difficultés. Les contrastes existant entre les deux nationalités qui s'éveillaient dans les limites de la même monarchie, s'accusèrent au lieu de disparaître. Les propositions que présentait le côté danois pour l'élaboration de la constitution commune qui devait servir de lien aux parties hétérogènes de la monarchie, différaient souvent dans leurs points essentiels de celles présentées par le côté allemand.

Lorsque, en 1854, le ministère, qui était partisan d'un état unitaire, essaya de faire passer une constitution commune qui, de sa propre autorité, mettait des bornes à la constitution de 1849, il s'éleva du côté danois une violente protestation, et dans le groupe protestataire nous rencontrons Jacobsen sous le coup d'une ardente indignation. En juin 1854, il est parmi ceux qui adressent au peuple un appel en faveur de la formation d'une association pour la sauvegarde de la Constitution, association qui réunit rapidement de nombreux membres. Comme une conséquence naturelle de son activité politique, Jacobsen fut élu, le 2 août de la même année, membre du *Folketing* (chambre des dé-

putes, et, a sa grande joie, le *Rigsdag* (assemblée nationale) réussit à faire tomber le ministère en question. Mais la chute du ministère ne constituait cependant pas la solution de la question d'une constitution commune; on devait nécessairement essayer d'en faire une; celle que le nouveau ministère libéral fit passer touchait le moins possible à la Constitution de 1849, néanmoins elle ne fut bien accueillie d'aucun parti. A ce moment, Jacobsen eût pu se démettre de son mandat de député, mais comme il s'était laissé elire, il voulut aussi rester à son poste jusqu'au bout de la période pour laquelle il avait été élu, et ce ne fut que deux ans plus tard qu'il se retira et du conseil municipal et de l'assemblée nationale.

Au *Folketing*, Jacobsen ne prenait pas souvent la parole, mais quand il le faisait, c'était en toute connaissance de cause; ne se laissant influencer par aucun parti, il ne jugeait les choses qu'en se plaçant a son seul point de vue de citoyen libre et indépendant. Aussi fut-ce avec un intérêt marqué qu'il vit en décembre 1856 le gouvernement — se basant sur un des paragraphes de la Constitution, qui laissait prévoir que les communes, sous la surveillance de l'Etat, pourraient gérer leurs propres affaires — presenter un projet concernant l'organisation de l'administration communale de la capitale; mais ce projet ne le satisfit aucunement, parce que, à son avis, il ne donnait pas aux bourgeois de la ville le pouvoir auquel ils avaient droit pour ce qui concernait leurs propres intérêts. C'est ainsi que l'on donnait au premier président, en sa qualité de délégué de l'Etat à la surveillance de l'administration municipale, des pouvoirs par trop étendus, et que l'administration serait une assemblée indépendante ayant des droits sur le conseil municipal; tandis que, selon lui, les membres de l'Administration ne devaient pouvoir agir qu'en tant que prenant part aux séances du conseil, où ils auraient également droit de vote, etc. Bien que ce projet fût présenté par le parti à l'appui duquel il devait son élection, il ne le combattit pas moins autant qu'il le put. Il s'était déjà montré adversaire de ce projet lors des débats qui avaient eu lieu au sein du conseil municipal dont il faisait partie, et il le combattit plus énergiquement encore

au *Folketing:* mais tous ses efforts n'aboutirent pas a le faire refondre. Le 4 mars 1857, ce projet était voté et, dans son indignation, il ne se représenta plus ni aux élections du conseil municipal (1857), ni à celles du *Folketing* (1858).

Chose très curieuse, lorsque, selon la nouvelle loi, on dut élire quatre bourgmestres à Copenhague, on pensa sérieusement à lui offrir un de ces postes; et on fit à cet effet des démarches pressantes auprès de lui, ce qui prouve hautement l'estime que lui avait value sa manière d'agir dans ces deux assemblées. Mais, esprit rigoureusement logique, mettant toujours d'accord ses actes avec sa pensée, il répondit par un refus au choix qu'on faisait de lui pour ce poste, étant, dit-il, un adversaire décidé de la loi d'après laquelle on voulait le nommer, et, ajouta-t-il encore: »Je n'ai nulle envie, ni de renoncer à mon état de brasseur dans lequel je mets mon honneur et ma joie, ni même de le mettre de côté.« Ce sont là de fières paroles qui sûrement se rattachent à ce qu'il se faisait gloire de ses titres de citoyen et de bourgeois, et qu'il se faisait toujours appeler Capitaine. Dans sa jeunesse, en effet, il avait servi, de 1837 à 1843, dans la milice bourgeoise de Copenhague avec le grade de lieutenant; il avait quitté le service depuis quelques années quand, par suite des exigences de la guerre de trois ans (1848 — 1850), la milice bourgeoise dut mettre à réquisition toutes les bonnes volontés; il s'empressa alors de le reprendre, et il y resta de 1848 à 1851 avec le grade de Capitaine, chef de compagnie. C'est depuis lors qu'il tint tant à ce titre qui prouvait, disait-il, qu'il était un citoyen sorti du peuple.

Mais avant de revenir sur l'activité industrielle du brasseur de Carlsberg, nous allons résumer son action politique. En effet, il s'était laissé décider en 1861 à accepter sa réélection au *Folketing*. Les difficultés que rencontraient les efforts faits pour réunir les diverses parties formant le royaume du Danemark sous une constitution commune, se montraient de plus en plus insurmontables. Du côté danois, on finit par exprimer le désir de détacher du royaume le duché allemand du Holstein, et Jacobsen était d'avis que c'était la seule manière de régler cette question

nationale; aussi le faisait-il comprendre quand, en 1861, dans sa profession de foi à ses électeurs, il prononça ces paroles: «Donnez au Danemark ce qui est au Danemark, et au Holstein ce qui est au Holstein». C'est pourquoi, lorsque, en 1863, le gouvernement soumit au *Rigsdag* le projet d'une nouvelle constitution basée sur cette manière de voir et en suite de laquelle le duché danois du Slesvig serait intimement réuni au royaume du Danemark, il se rallia pleinement à ce projet. Sur ces entrefaites, le roi Frederik VII vint à mourir — évènement aussi inattendu que funeste —, et Jacobsen fut un de ceux des membres du *Rigsdag* qui adressèrent des remerciements à son successeur, le roi Christian IX, parce qu'en signant le 18 novembre 1863 la nouvelle constitution, il avait «fait valoir la liberté et l'indépendance du pays vis-à-vis des réclamations des puissances étrangères qui exigeaient l'annulation de cette loi».

Voilà donc les espérances de 1848 enfin réalisées, le Slesvig, ce vieux domaine de la couronne danoise, rendu au Danemark! . . . Mais il n'en fut ainsi que sur le papier. Les puissances allemandes l'Autriche et la Prusse envoyèrent leurs armées pour envahir la frontière et, après avoir repoussé héroïquement leurs attaques, la petite armée danoise dut céder à la force du nombre. Le 30 octobre 1864, la paix fut conclue dans des conditions déplorables, le Slesvig, objet des représailles, était mis sous la domination allemande, et le traité de paix ne tarda pas à être soumis à l'approbation du *Rigsdag*. Ce furent des jours pénibles pour Jacobsen, son cœur était rempli d'une profonde douleur: il lui était impossible de voter pour la paix; d'un autre côté, on ne pouvait pas braver les désirs du peuple; aussi s'abstint-il de voter. De même qu'il avait fait son possible pour soutenir l'armée combattante, de même aussi se mit-il maintenant à employer avec ardeur tout moyen loyal pour soutenir le sentiment national danois dans le pays arraché au Danemark.

Entre temps, du *Folketing* Jacobsen avait passé au *Landsting* (sénat) par nomination royale et, en cette qualité, il prit encore pendant un certain temps part à la politique. Il s'agissait alors de donner une constitution définitive au Danemark tel qu'il était

resté après ces tristes évènements. Dans les débats qui eurent lieu à ce sujet, Jacobsen se plaça résolument au point de vue conservateur, voulant assurer au *Landsting* du nouveau *Rigsdag* un pouvoir prépondérant vis-à-vis du *Folketing*. Afin de pouvoir assurer l'indépendance des représentants, il aurait voulu qu'ils ne reçussent aucune indemnité parlementaire; mais comme cela ne pouvait absolument pas se faire, il dut se contenter du pouvoir qui avait été accordé au Landsting et qui fut définitivement fixé par la Constitution dite revisée du 26 juillet 1866. Après quoi il paraît se désintéresser petit à petit de la politique. En 1871, il donna sa démission de sénateur inamovible. A partir de ce moment, cet homme fort et conscient de sa valeur voulut avoir toute sa liberté d'action pour aider dans la mesure du possible le peuple danois à tenir sa place, en gardant son indépendance, parmi les nations européennes. Ainsi que nous le verrons plus tard, ses idées à ce sujet prirent peu à peu des formes grandioses. et la prospérité toujours croissante de sa brasserie le mit à même de les réaliser.

Comme nous l'avons dit précédemment, sa brasserie prospérait d'année en année. Mais, le 6 avril 1867, un incendie la détruisit, et il en résulta une perte de plus de 200 000 couronnes. Ce qui le caractérise bien, c'est que d'abord il ne s'était pas soucié de faire assurer sa brasserie, ce n'est que beaucoup plus tard qu'il s'était décidé à le faire; mais quand l'incendie éclata. un magasin à blé nouvellement construit ne l'était pas encore. C'est de ce fait que provinrent les pertes. Toutefois, Jacobsen n'en fut pas affecté, car, comme il le disait, »ce n'était qu'une perte d'argent«. Mais il ne fallait pas que cet incendie le mît dans l'impossibilité de livrer en automne comme d'habitude et que, par suite, d'autres eussent à en subir les conséquences. Les caves épargnées renfermaient la quantité de bière nécessaire pour les premiers temps et, comme on n'avait pas l'habitude de brasser pendant les mois d'été, il était urgent d'avoir la brasserie prête à fonctionner à nouveau pour l'automne. Il fallait absolument y arriver; aussi, pendant que l'incendie exerçait ses ravages, donnait-il déjà ses ordres dans ce but, qu'il

atteignit après avoir fait preuve d'une énergie extraordinaire. Le 1er septembre, la brasserie était reconstruite, agrandie, prête à marcher. Alors il crut sérieusement que Carlsberg avait atteint son maximum de développement. Mais, cette fois encore, il fut obligé par la force des choses a procéder à de nouveaux agrandissements. Sa bière étant de plus en plus demandée, il construisit en 1870 une nouvelle brasserie annexe, le premier des deux établissements dénommés Nouveau-Carlsberg, non plus pour son compte personnel, mais pour son fils, auquel il l'afferma. Ce nouvel arrangement n'empêcha pas sa propre production d'augmenter: en 1873, elle atteignait plus de 60 000 hectolitres.

Cet accroissement continuel de production le gênait, car il ne voulait en aucune manière réduire le temps nécessaire à la conservation de la bière. Mais il eut beau trier ses clients, exercer un contrôle sévère sur ses voituriers, rien n' y fit; il lui fallait toujours plus de bière. Il dut se mettre à brasser aussi le dimanche, voire même pendant les mois d'été pendant lesquels on ne brassait habituellement jamais, tout cela sans arriver à produire suffisamment. En 1878, il atteignait 109 000 hectolitres, en 1882, 126 000; il se résolut alors à dénoncer le contrat de son fils, reprit à la fin de 1882 pour son propre compte la brasserie qu'il avait construite pour lui, ce qui fit monter sa production annuelle a 192 000 hectolitres. Mais malgré cela, et malgré le fait que maintenant il s'était établi d'autres brasseries à côté de la sienne, c'était toujours la bière de Carlsberg qu'on réclamait le plus. Aussi croyait-il pouvoir se mettre tout à fait au-dessus de la concurrence, qui se manifestait de diverses manières et qui ne l'atteignait pas, pensait-il. Mais les débitants de bière qui vendaient la sienne ne pouvaient pas raisonner comme lui, ils souffraient de la concurrence et lui firent à ce sujet plaintes sur plaintes. Finalement, en juillet 1886, Jacobsen leur adressa sa réponse: lorsqu'il croira le moment venu, il saura bien agir énergiquement. «La seule manière d'agir qui convienne à Vieux-Carlsberg pour combattre le rabais que les autres brasseries accordent en dessous», écrivait-il, «serait de baisser ses prix ouvertement et généralement», et il était en outre tout prêt, si cela

devenait nécessaire, à augmenter encore la production de sa brasserie. «Pour moi, je préférerais de beaucoup ne pas avoir à procéder à de nouveaux agrandissements; mais Vieux-Carlsberg ne doit pas faillir à sa tâche, qui est d'être à la tête de la fabrication de la bière et de l'industrie brassicole en général dans le pays, et je ne dois pas hésiter à faire dans ce but les sacrifices nécessaires».

Ces nobles et fières paroles n'auraient certainement pas été de vains mots et, au moment voulu, il aurait su déployer l'énergie et la force voulues. Mais ce moment ne vint pas. Depuis longtemps déjà, il nourrissait le désir de revoir Rome, où il n'avait plus été depuis 1862. Au commencement de l'année 1887, il s'y rendit avec sa femme, son fils et sa belle-fille, il y tomba malade, et c'est dans cette ville qu'il expira le 30 avril de la même année. —

A ses débuts, la brasserie Carlsberg travaillait selon la routine du temps. En 1847, on y installa des chaudières sans couvercles sur des foyers ordinaires, et des cuves-matière en bois dans lesquelles le brassin était remué avec des ustensiles en bois ayant la forme de rames et qui demandaient quatre hommes pour les tourner, etc.; mais, petit à petit, la brasserie se transforma en une fabrique immense toute remplie de machines reluisantes. Des 4000 hectolitres que la brasserie produisait dans les premières années de son existence, elle était arrivée, vers la fin de la vie de son fondateur, à en produire plus de 200000. A cette époque, il ne lui restait plus rien de son origine obscure: tel un cygne resplendissant, elle s'était élevée à coups d'ailes puissants. Carlsberg était devenu un haut fait de l'industrie danoise, dont l'importance dépassa les frontières du Danemark et qui arriva à prendre la tête même à l'étranger.

Jacobsen voyagea beaucoup. Chaque année, il visitait ses collègues à l'étranger et se mettait ainsi au courant de tous les progrès réalisés. Mais, avec le temps, sa brasserie prit un développement tel que les brasseurs des autres pays vinrent à leur tour apprendre quelque chose à Carlsberg.

Ayant vu en divers endroits essayer, mais sans succès, d'ope-

rer la cuisson de la bière à la vapeur, l'idée lui vint de faire lui aussi des essais, ayant une foi absolue dans la réussite, et il arriva au resultat voulu après avoir expérimenté avec persévérance pendant un temps assez long. Jacobsen en fit l'objet d'un rapport au grand congrès de brasseurs qui eut lieu à Vienne en 1873 lors de l'Exposition universelle, au cours de laquelle la bière Carlsberg fit sensation, exposée qu'elle était en bouteilles dont un grand nombre étaient accompagnées de certificats des consuls autrichiens de Singapore, Rio Janeiro, Valparaiso et autres villes éloignees, attestant les longs voyages que lesdites bouteilles avaient faits. Carlsberg devint le centre de l'attention générale. La revue fondée à l'occasion de l'Exposition par le directeur des brasseries réunies de Gaudenz, M. Franz Fasbender, — l'«Allgemeine Zeitschrift für Bierbrauerei und Malzfabrikation» —, cita Carlsberg comme etant un établissement modèle, et c'est aussi comme tel que, à la longue, il fut généralement apprécié. Le celèbre inventeur des machines frigorifiques, le Dr Carl Linde, déclara que le développement auquel ses machines étaient parvenues fut uniquement dû à l'aide intelligente des brasseurs Sedlmayr à Munich, Feltmann à Rotterdam, et Jacobsen à Copenhague. Et Pasteur lui-même loua l'air des caves de Carlsberg qui, disait-il, avait la pureté de l'air qui plane sur les cimes des Alpes.

Jacobsen ne mit pas seulement la technique à son service, mais aussi la science. En 1871, il avait installé à Carlsberg un petit laboratoire, et, en 1875, il alla plus loin encore: il fonda un grand etablissement scientifique ayant une section chimique et une section physiologique pour servir à l'étude scientifique des divers procès du maltage, de ceux du brassage et de la fermentation. Jacobsen comprenait clairement la haute importance qu'a la science dans la vie pratique, et c'est à quoi nous sommes redevables d'un don de 1 000 000 de couronnes que, sous la dénomination de «Donation Carlsberg», il remit à la Direction de l'Académie Royale des Sciences et des Lettres de Danemark. Il fit cette donation dans le but d'assurer la continuation et de pourvoir au développement du laboratoire chimique et physiologique de Carlsberg, comme aussi de favoriser l'étude des sciences naturelles,

des mathématiques, de l'histoire et des langues, et ce particulièrement là où l'Etat ne pourrait pas accorder les subsides nécessaires. Ce qui caractérise encore davantage le désintéressement et la grandeur d'âme de Jacobsen, c'est la disposition qu'il prit de ne tenir secret aucun des résultats acquis au Laboratoire, mais de les publier, et, à partir de juillet 1878, il fit paraître les «Comptes-rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg», contenant des mémoires qui furent bien vite appréciés autant à l'étranger qu'au Danemark. La direction du laboratoire de chimie avait été confiée au Professeur Johan Kjeldahl, et celle de la section physiologique au Professeur Emil Chr. Hansen.

Dans sa lettre à l'Académie Royale des Sciences et des Lettres de Danemark, Jacobsen dit qu'il fonde la «Donation Carlsberg» en reconnaissance de ce qu'il doit à l'enseignement et à l'influence vivifiante de H. C. Örsted, et il est à remarquer que cette lettre qui spécifie et assure cette donation, est datée du 25 septembre 1876 et que c'est justement ce jour-là que fut inauguré dans un parc de Copenhague un beau monument érigé en l'honneur de H. C. Örsted et dû en grande partie aux efforts de Jacobsen, qui avait aussi gardé un souvenir reconnaissant au grand savant danois pour ce qu'il croyait lui devoir, et il est intéressant de constater que ses rapports avec Pasteur se développèrent d'une manière analogue.

La même année où Jacobsen fondait la «Donation Carlsberg», Louis Pasteur faisait paraître ses «Etudes sur la bière», ouvrage qui fit époque dans la science brassicole. L'illustre savant français levait le voile qui jusqu'alors avait recouvert les mystérieux phénomènes de la fermentation contre lesquels les brasseurs avaient lutté désespérément. Depuis longtemps déjà, Jacobsen s'était en vain plongé dans l'étude des ouvrages de Hermbstädt, Balling et Liebig; mais voici que Pasteur démontrait que la fermentation incomprise à ce jour était due à l'action du champignon de levure et que la levure de bière, pendant les mois d'été surtout, était exposée à s'altérer par suite de l'action des microbes renfermés dans l'air atmosphérique; il montrait en même temps comment il était possible, en traitant la bière d'une

certaine manière, de détruire l'influence de ces organismes étrangers ou, tout au moins, de la diminuer. Frappé du génie qui marquait le travail de Pasteur, Jacobsen chercha à lui témoigner son admiration et, dans ce but, il lui écrivit pour lui exprimer le désir qu'il avait de placer son buste au Laboratoire de Carlsberg, lui demandant en même temps l'autorisation de le faire faire à son célèbre compatriote Paul Dubois. Pasteur lui en témoigna sa reconnaissance de plusieurs manières, entre autres, en lui dédiant un de ses ouvrages; dans des termes choisis, il le remercie d'avoir fondé le Laboratoire de Carlsberg et, par là, d'avoir donné un bel exemple de reconnaissance envers la science, et il le cite comme étant une célébrité parmi les brasseurs européens.

C'est à ce moment que le chef du service physiologique du Laboratoire de Carlsberg, Emil Chr. Hansen, imagina une méthode pour la préparation de la levure pure en partant d'une cellule unique de levure, ce qui, à son avis, était seul rationnel, et il démontra par là que la levure pure de Pasteur, bien qu'étant débarrassée des bactéries, pouvait néanmoins être un mélange de diverses espèces de levure dont quelques-unes — les levures de culture — donnaient la fermentation voulue, tandis que d'autres — les levures adventices, dites «sauvages» — provoquaient des fermentations qui avaient pour effet d'altérer la bière. Désirant vivement faire des essais sur une grande échelle avec une levure d'ensemencement développée en culture pure d'une cellule unique choisie à cet effet, il s'en ouvrit à Jacobsen, mais celui-ci ne fut d'abord pas porté à donner satisfaction à Hansen, croyant qu'il n'était pas possible d'amener à l'aide d'une cellule unique de levure la fermentation de la bière à bonne fin, pas plus la fermentation principale dans les cuves à fermentation que la fermentation secondaire plus lente qui se produit dans les foudres en cave de garde; en outre, comme Pasteur était à ses yeux une autorité ne pouvant pas être surpassée, il ne pouvait pas admettre que les levures «sauvages» spontanées pussent exercer une action nuisible. Bien que, à cette époque-là, la bière de Carlsberg ne fût pas parfaite sous le rapport de la qualité, Jacobsen ne pouvait pas se décider à accéder au désir de Hansen; il pensait

plutôt à procurer à Carlsberg, qui n'avait encore jamais changé de levure, une nouvelle levure de Munich, et il fit faire dans ce but des recherches minutieuses dans son laboratoire. Après un travail opiniâtre, Hansen, par une nouvelle expérience, arriva à lui faire constater que les défauts relevés dans la qualité de ses produits étaient dus aux levures sauvages. Il se rendit alors à l'évidence et consentit à ce que les essais se fissent en grand. Le 12 novembre 1883, une levure réellement cultivée à l'etat de pureté servit pour la première fois de levure d'ensemencement dans une brasserie.

La communication de ce brassage qui avait pleinement réussi, fit grande sensation, et comme en même temps — au printemps de l'année 1884 — on avait envoyé des échantillons de la levure utilisée, on multiplia bientôt dans toute l'Europe les essais avec la levure pure. La «Zeitschrift für das gesammte Brauwesen» de Munich en salua l'apparition avec une joie sans mélange; par contre, la «Wochenschrift für Brauerei» de Berlin fit de l'opposition. Il s'éleva à ce sujet de vifs débats, auxquels Jacobsen aussi prit part; mais au fur et à mesure que l'on vint à comprendre qu'il était possible d'obtenir de la levure d'ensemencement usagée dans chaque brasserie des cultures pures aptes à donner à la bière les propriétés répondant au point de vue du goût et de la conservation aux exigences de leur clientèle, l'opposition tomba, et la levure pure victorieuse porta dans le monde entier les noms de Hansen, Jacobsen et Carlsberg. C'était la section physiologique du Laboratoire qui dans ces faits s'était fait valoir, mais la section chimique ne resta pas en arrière: ce fut également en 1883 que Johan Kjeldahl, ayant imaginé une méthode pour le dosage de l'azote, se fit remarquer, et sa découverte fit à bon droit aussi grande sensation que celle de Emil Chr. Hansen. De toutes parts, on en remercia Jacobsen. C'est ainsi que s'étant rendu en juin 1884 chez son confrère Johann von Götz, à Okoczim près de Cracovie, celui-ci fit un soir défiler devant lui, musique en tête, tout le personnel de sa brasserie, et, aux applaudissements de l'assistance, il l'acclama comme le grand maître du monde brassicole.

Dans ce domaine, Emil Chr. Hansen dépassa de beaucoup Pasteur, mais sans ternir en aucune façon l'éclat de son illustre devancier aux yeux de Jacobsen. L'admiration qu'il lui avait vouée resta aussi grande et aussi vive, et il lui en donna plus d'une preuve. C'est ainsi que lors du Congrès international des médecins qui eut lieu à Copenhague en 1884, Pasteur —, qui participait au Congrès —, fut l'hôte de Jacobsen, qui donna en son honneur une fête magnifique dans la splendide demeure qu'il s'était créée.

Lorsque, en 1847, Jacobsen construisit sa brasserie, ce fut un architecte, M. Stilling, qui dirigea les travaux basés sur ses indications à lui, et quand au cours des années 1852—1854, il fit construire le corps principal des bâtiments de Carlsberg, Jacobsen prit bien encore un architecte — M. N. S. Nebelong —, mais, loin de s'en remettre entièrement à lui, ce fut Jacobsen qui lui fit admettre ses idées, soit qu'il s'agît du bâtiment en lui-même, ou du système de ventilation et de chauffage dont il dirigea personnellement l'installation, ou même encore de la décoration en pur style pompéien de ses belles salles de réception. Et lorsque finalement il ajouta à cette construction une cour à colonnes grecque, il le fit sans l'aide d'aucun architecte; son ingénieuse compréhension du style dorique lui permit de dessiner jusque dans ses plus petits détails ce magnifique édifice. Habile mathématicien, il calculait et construisait facilement et sûrement, tout en s'appuyant en même temps sur un vif sentiment du beau. Il possédait des aptitudes qui eussent pu faire de lui un architecte éminent, et il eût également été capable de tenir sa place dans d'autres situations. Son jardin de Carlsberg est une preuve de l'étendue de ses connaissances botaniques comme aussi celle d'un grand amour des plantes et des arbres de tous genres.

Ce fut donc tout naturel, lorsqu' il fut question de transférer ailleurs le jardin botanique de l'Université, que le gouvernement le nommât membre de la commission chargée de ce transfert; comme président du Comité exécutif, il apporta, de 1871 à 1874, à son travail tout son savoir et tout son zèle, et son influence se fit principalement sentir dans la construction de la serre du

nouveau jardin, qui revêtit les belles proportions et les dispositions pratiques qui la distinguent. Et comme les subsides accordés par l'Etat pour cette entreprise ne devaient pas être dépassés, il y suppléa avec la largesse dont il devait encore donner tant de preuves dans la suite. Nous mentionnerons en passant qu'il fit don au nouveau Théâtre national à Copenhague inauguré en 1874, pour en orner le foyer, des bustes en marbre de poètes et d'acteurs danois.

Mais il devait donner beaucoup plus encore à son pays. Lorsque, en 1876, il fonda la «Donation Carlsberg», ce ne fut pas seulement «au profit de la Science», ce fut aussi «à l'honneur de la Patrie». Si le profond chagrin que les malheureux évènements de 1864 lui firent éprouver, le porta immédiatement à donner son aide pour le soutien du sentiment national dans le pays arraché au Danemark — ce qu'il fit tant qu'il vécut —, il le porta également à comprendre que, pour rester un état indépendant, son petit pays ainsi amoindri devrait nécessairement tendre à une forte vie intellectuelle. Aussi ne sera-ce pas la science en général, mais la science en Danemark que la Donation Carlsberg aura pour tâche de soutenir, et vient-on à parcourir la longue liste des entreprises et des œuvres importantes qui, malgré la petitesse du pays, ont vu le jour grâce à la Donation Carlsberg, on ne peut que s'incliner devant les résultats obtenus.

Après 1864, il se fit un grand mouvement pour relever le pays. Tandis que Dalgas s'occupait du défrichement des bruyères en Jutland, que N. J. Fjord aidait au développement de l'agriculture par ses expériences d'une grande portée pratique, et que Tietgen donnait l'éveil à une vie économique dont le pays avait grand besoin, Jacobsen lui, tout en tendant naturellement au même but, chercha à l'atteindre par d'autres moyens; et ce qui le caractérise bien, c'est que, ayant eu la pensée de travailler à augmenter l'amour de la patrie, il entrevit la possibilité d'arriver par des moyens directs à éveiller dans les cœurs un amour pur et désintéressé envers la patrie. Et, comme toujours, il agit avec l'indépendance qui lui était propre.

Le 17 décembre 1859, Frederiksborg, le superbe château bâti par Christian IV, était détruit par un incendie, et le pays entier en fut profondément affecté. Jacobsen, qui autrefois avait visité ce château avec son père et avait été pénétré de sa grandeur et de sa beauté, en ressentit une vive douleur. Une souscription nationale ayant été organisée dans le but de reconstruire le château, il fut un des premiers souscripteurs, et comme on s'était immédiatement mis à l'œuvre, la chapelle du château, qui était en même temps église paroissiale, put déjà être inaugurée le 28 août 1864, mais il restait encore deux ailes à reconstruire: l'aile du Roi et celle des Princesses, et elles le furent aussi. Le pays, malheureusement, traversait alors des temps très difficiles, et il était à prévoir que la restauration de l'intérieur des ailes ne serait pas possible avant longtemps. Jacobsen avait orné la chapelle de vingt-trois tableaux, et fait don du prie-Dieu et promis son aide pour l'ornementation de la salle des Chevaliers ainsi que pour celle dite la Rose, qui était la seule se trouvant en dehors de l'aile de l'église.

Le château paraissait devoir rester vide: une écorce brillante recouvrant des poutres et des murs. C'est alors que la pensée vint à Jacobsen de créer à ce château si riche en souvenirs historiques du passé un avenir digne de ce passé en en faisant le foyer des souvenirs historiques de la nation danoise tout entière. Il lui parut que c'était précisément là l'endroit par excellence où une collection racontant la part que le Danemark avait prise dans le passé au développement général de la civilisation, ne pouvait qu'éveiller et fortifier le sentiment des devoirs qu'un pareil héritage impose aux générations futures. Et c'est ainsi qu'il se décida à fonder un Musée historique-national qui, avec l'aide de l'art, devait pouvoir parler à tout cœur danois.

Le 19 avril 1877, faisant prendre corps à sa pensée, et en prévision que son projet tendant à l'érection d'un musée sera agréé, il offrit au comité de la reconstruction de Frederiksborg deux cent mille couronnes pour la restauration de l'aile du Roi. Ces offres magnifiques furent acceptées avec joie et reconnaissance, et le 26 juin paraissait déjà le rescrit royal qui sanction-

nait son projet. Il fallut alors penser à donner une administration au Musée, et Jacobsen ne crut pas pouvoir faire mieux que d'en former une troisième section de la Donation Carlsberg dont elle dépendrait par le fait. Il en écrivit à l'Académie Royale des Sciences et des Lettres, et celle-ci s'étant rangée à son avis, il ajouta le 1er janvier 1878 la somme de 200000 couronnes à la Donation, assurant ainsi au Musée un revenu annuel de 10000 couronnes. On se mit donc à l'œuvre, mais au fur et à mesure que les travaux avancèrent, Jacobsen comprit que l'aile du Roi ne suffirait pas et que 10000 couronnes n'assureraient pas au Musée un revenu suffisant. Il se déclara alors prêt à remettre encore 200000 couronnes au comité de la reconstruction du château afin que l'aile des Princesses pût également être restaurée pour le Musée. Tout étant terminé selon ses désirs, il ajouta en août 1878 un nouveau million à la Donation Carlsberg, de sorte que la section du Laboratoire eut son revenu annuel augmenté de 10000 couronnes, la section scientifique, de 15000, tandis que le revenu annuel du Musée était porté à 35000 couronnes.

Dans l'administration du Musée dont il faisait partie, il occupait une place spéciale, et il ne tarda pas à en devenir l'âme. Il lui communiqua pour ainsi dire quelque chose de l'énergie qui lui était propre, si bien que le 17 décembre 1884, au 25ème anniversaire de l'incendie du château de Frederiksborg, le Musée fut officiellement inauguré. L'intérêt que Jacobsen porta à Frederiksborg alla toujours en augmentant; nous le voyons par les chiffres: tandis que de 1859 à 1867, il ne donnait que 4200 couronnes, de 1857 à 1877, il en donnait 89445, et de 1877 à 1887, il alla jusqu' à donner 594115 couronnes, sans compter ce qu'il donna par la «Donation Carlsberg», et sans compter aussi les sommes que sa veuve versa après sa mort pour la reconstruction de l'ancienne fontaine dans la première cour du château ainsi que pour le placement d'un carillon dans la tour. Animé d'un désir ardent de voir le château se relever dans toute son ancienne splendeur, Jacobsen s'était beaucoup occupé de ces deux projets dans les dernières années de sa vie; mais la mort le surprit avant qu'ils fussent réalisés.

Jacobsen apparaît comme un homme remarquable, grand et tout d'une pièce, dont on se souviendra longtemps. Il était fait pour de grandes choses, et c'est pourquoi les témoignages ordinaires de la faveur officielle paraissent si peu de chose en regard de sa personnalité et de son œuvre. En 1870, dans son attachement à la France, à son esprit et à sa culture, et sous l'impression des combats livrés par la vaillante armée française, avec deux concitoyens il fit appel avec succès à la générosité de ses compatriotes, leur demandant de contribuer par une offrande au soulagement des blessés et des victimes de la guerre; en 1871, il fut nommé, ainsi que ses cosignataires, chevalier de la Légion d'honneur, et dans son propre pays il passa en même temps Commandeur du Danebrog. Il ne reçut pas d'autres distinctions. Il n'en désirait absolument aucune, et son roi, le chevaleresque Christian IX, l'avait senti et compris. Aussi, lorsque, en 1876, Jacobsen eut fondé la Donation Carlsberg, le roi lui fit-il simplement annoncer sa visite à Carlsberg. Il voulait en personne le remercier en son nom et au nom du pays tout entier du don insigne qu'il lui avait fait, et c'est encore d'une manière tout aussi délicate qu'il lui exprima sa gratitude pour avoir établi le musée historique-national: Sa Majesté fit sculpter dans le marbre le buste de Jacobsen pour le placer au musée. Il y avait un geste de grandeur dans ces remerciements empreints d'une simplicité cordiale, et nul doute que Jacobsen n'en ait été touché et heureux, tout comme il l'a aussi été de l'adresse couverte de plusieurs centaines de signatures qui lui fut remise en mars 1877 par des concitoyens. Nous mentionnerons encore ici que, à l'occasion du 4ème centenaire de sa fondation, l'Université de Copenhague lui décerna le diplôme de docteur. Il était tout naturel que l'Université désirât lui accorder cette distinction; plus que tout autre, en effet, le fondateur de la Donation Carlsberg avait bien mérité de la Science en favorisant les sciences dans sa patrie, mais tout aussi caractéristique pour Jacobsen est le fait qu'il ne céda au désir de l'Université qu'après s'y être d'abord fortement opposé. Comme nous l'avons déjà dit, il tenait par-dessus tout à être appelé capitaine en souvenir de la charge qu'il avait remplie dans la garde

civique de Copenhague, et il garda cette préférence jusqu'à la fin de ses jours. Il avait été et resta toujours un citoyen libre et indépendant dans sa ville natale, — mais en même temps, il se montra constamment le fils dévoué de sa patrie, et il en donna une dernière preuve dans son testament.

Par cet acte, il instituait pour son héritier la Donation Carlsberg et ne lui léguait rien moins que Carlsberg avec toutes ses dépendances: brasseries, bâtiments divers, serres et jardins. Comme on le voit, il avait voulu que, même après sa mort, la brasserie Carlsberg pût remplir la mission à laquelle, selon lui, elle était destinée: «Sans avoir égard aux avantages du moment», écrivait-il, »son but constant doit être d'amener sa fabrication à la plus grande perfection possible, de manière à ce que Carlsberg et ses produits puissent toujours être cités comme des modèles et contribuer ainsi à ce que l'industrie brassicole du pays se maintienne à son rang élevé et honorable». Toutefois, la brasserie n'est pas le but, mais seulement un moyen. Avec tout ce qu'il a créé au cours de sa belle et laborieuse carrière, il met la source même de ses richesses à la disposition de la Donation, afin que cette institution soit sauvegardée et qu'elle puisse atteindre son but, en un mot, il lègue sa brasserie à son pays. C'est sous ce jour, en effet, que son œuvre doit être vue. Elle s'est concentrée dans l'établissement du musée historique-national de Frederiksborg. Les objets d'arts et autres représentations qui s'y trouvent, depuis les Vikings aux Valdemar, de Christian IV jusqu'aux héros des guerres du Slesvig, sont, de la première à la dernière, comme l'expression de son vœu ardent que le peuple danois, poussé par l'amour de son pays, travaille constamment à grandir en valeur et gagner en considération. Dans ce musée où tout rappelle le grand citoyen qui le créa, la voix du magnanime bienfaiteur parlera, exhortera toujours.

SUR LA COAGULATION DES SUBSTANCES PROTÉIQUES PAR CHAUFFAGE.

I. LA CONCENTRATION EN IONS HYDROGÈNE DU MILIEU SUBIT-ELLE DES MODIFICATIONS PAR SUITE DE LA COAGULATION?

PAR

S. P. L. SØRENSEN ET E. JÜRGENSEN.

Lors de recherches de chimie biologique, on a souvent à débarrasser une solution des corps protéiques coagulables qu'elle pourrait contenir. On sait que le procédé habituel en pareil cas consiste à chauffer la solution très légèrement acide et additionnée d'une quantité abondante d'un sel convenable, pour en séparer ainsi la protéine naturelle à l'état coagulé. Comme cependant il s'agit ordinairement de constater la présence, ou peut-être même d'effectuer la détermination quantitative, de substances non-coagulables dont la recherche plus approfondie n'est rendue possible que par l'élimination de la protéine naturelle, il est de toute évidence qu'il faut éviter autant que possible, au cours du processus de coagulation, toute addition de substances étrangères, par exemple de sels. D'un autre côté, en ce qui concerne les solutions protéiques renfermant peu ou pas de sel, il est connu depuis longtemps déjà, qu'on ne parvient à les faire coaguler d'une façon complète qu'à la condition de trouver bien exactement le degré d'acidité approprié.

Par conséquent, le procédé de précipitation proposé par L. Michaelis et P. Rona[1]), de matières protéiques naturelles au moyen de mastic ou d'autres substances colloïdales, signifie un progrès notable et peut rendre de bons services dans bien des cas, surtout quand on emploie comme électrolyte l'acétate cuivrique, dont le métal peut être éliminé plus tard à l'aide de l'acide

[1]) Biochemische Zeitschrift **2**, 219 (1906); **3**, 109 (1906); **4**, 11 (1907); **5**, 365 (1907); **6**, 1 (1907); **7**, 329 et 488 (1907); **8**, 356 (1908).

hydrosulfurique. Cependant il ne peut guère y avoir de doute que la manière la plus naturelle d'éliminer des protéines coagulables ne doive être la coagulation, pourvu que l'on puisse parvenir à mener cette opération à bonne fin sans ajouter de sels ou d'autres substances étrangères en quantité appréciable. En effet, de cette façon, ce ne sont probablement que les substances réellement coagulables qui sont précipitées, alors que, en employant n'importe quelle autre méthode de précipitation, y compris celle préconisée par Michaelis et Rona, on évitera à peine de précipiter, en même temps que les composés coagulables, une partie de ceux qui ne le sont pas.

C'est en nous basant sur des considérations de ce genre que, pour faire suite à des travaux analogues exécutés dans notre laboratoire, nous avons institué, il y a deux ans environ, des recherches concernant l'importance que présente dans la réaction de coagulation la concentration des ions hydrogène. Ces recherches, d'accord en cela avec ce que nous venons de dire, montrèrent que, pour obtenir une coagulation totale, il était de la plus grande importance de maintenir dans des limites assez étroites la concentration des ions hydrogène de la solution en question, particulièrement lorsque celle-ci était pauvre en sels. Cependant nous avons pu constater encore, que même sans addition de sel il était possible de réaliser une coagulation tout aussi complète, ou même plus complète encore — en tout cas plus rapide —, si l'opération était effectuée à la concentration optimale en ions hydrogène. Si l'on a soin de maintenir constantes les conditions de l'expérience (concentration protéique et teneur en sel de la solution, durée de la coagulation), cette concentration optimale possède alors une valeur constante, indépendante de la nature de l'acide présent.

Tant pour le sérum sanguin que pour le blanc d'œuf de poule, les deux seules solutions protéiques sur lesquelles nous avons opéré jusqu'ici, la concentration optimale en ions hydrogène, aux conditions expérimentales habituellement choisies par nous, répond à l'exposant d'ions hydrogène $p_H^+ =$ env. 4.7 [1]). Toutefois, il ne peut être question d'une valeur absolument constante de la concentration ionique la plus favorable à la coagu-

[1]) Pour la signification de p_H^+, exposant d'ions hydrogène, nous renvoyons le lecteur aux Comptes-rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg **8**, 28 (1909).

lation, parce que — comme nous l'exposerons plus loin, dans la partie expérimentale (voir page 27 et p. 39) — cette concentration dépend de celle de la protéine ainsi que de la teneur en sel de la solution.

A notre avis, il est hors de doute que la concentration optimale en ions hydrogène se rattache étroitement a ce qu'on est convenu d'appeler le «*point isoélectrique*» des substances protéiques, point sur l'importance et la position duquel plusieurs travaux publiés en 1909—10 par L. Michaelis, P. Rona, B. Mostynski et H. Davidsohn[1]) ont apporté des éclaircissements nouveaux et très importants. D'après les idées avancées par Michaelis et Rona au sujet de la nature du processus de coagulation, on peut s'attendre à voir la concentration optimale d'ions hydrogène de cette coagulation coïncider avec la concentration ionique correspondant au «point isoélectrique» de la protéine en question.

Les résultats auxquels nous sommes arrivés ne semblent pas confirmer tout à fait cette manière de voir. En effet, tandis que suivant les considérations théoriques émises par Michaelis[2]) le «point isoélectrique» doit avoir une situation invariable, nos expériences ont établi, par contre, — comme on l'a vu plus haut —, que la concentration ionique optimale est dépendante autant de la concentration protéique que de la teneur en sel du milieu.

Nos résultats concordent sensiblement avec la manière de voir soutenue dernièrement par W. Pauli et R. Wagner[3]), à savoir que dans la détermination faite par Michaelis et ses collaborateurs des conditions les plus favorables pour la coagulation, il s'agit principalemeut d'une neutralisation de matières alcalines présentes. Nos expériences nous ont conduits à envisager la chose d'une façon semblable; car, pour des raisons expliquées dans la partie expérimentale (voir p. 34), nous sommes portés a croire que, dans la coagulation d'une solution protéique pure, la concentration optimale en ions hydrogène est due essentiellement au caractère acide de la protéine même, et que, de ce fait, elle doit être fonction de la concentration protéique.

[1]) Biochem. Zeitschr. **19**, 181 (1909); **24**, 79 (1910); **25**, 401 (1910); **27**, 38 (1910); **28**, 1 et 193 (1910); **29**, 494 (1910), et **30**, 143 (1910).
[2]) Ibid. **19**, 184 (1909) et **24**, 80 (1910).
[3]) Ibid. **27**, 300 (1910).

La question relative à la modification que subit au cours de la coagulation la concentration d'ions hydrogène, se rattache étroitement à celle de savoir quelle est la concentration ionique la plus favorable pour la coagulation. C'est cette question-là qui fait le sujet principal du présent mémoire. Elle n'a pas, à notre connaissance, été examinée de plus près jusqu'ici; mais on admet généralement que la coagulation fait déplacer la réaction du milieu dans la direction du côté alcalin. Dans l'ouvrage bien connu d'O. Cohnheim «Chemie der Eiweisskörper» 1904), ce fait se trouve signalé dans les termes suivants (p. 132): «Beim Koagulieren einer beliebigen Eiweisslösung, die irgendwelche Salze, Säuren oder Basen enthält, verschiebt sich die Reaktion nach der alkalischen Seite, so dass eine neutrale oder selbst schwach saure Losung beim Kochen deutlich alkalisch wird. Der Grund ist unbekannt».

Michaelis et Rona[1]), au contraire, estiment que la coagulation du sérum, si l'on tient dûment compte de l'acide carbonique en présence, ne donne pas lieu à une modification de reaction: «Beim Denaturieren des Serums durch Hitze mit oder ohne Gerinnung ändert sich, wenn man die Austreibung von CO_2 verhindert, die nach dem Erkalten bestimmte Reaktion nicht, und ebensowenig das Säurebindungsvermögen des Serums» (à l'endroit cité, p. 339). Il ressort cependant des résultats numériques de ces auteurs que ce n'est que dans un seul cas qu'ils ont effectué la coagulation à une concentration ionique se rapprochant de celle qui favorise le mieux la coagulation; dans cet essai (N° 1, p. 336) la réaction s'est d'ailleurs modifiée d'une manière très marquée du côté alcalin. Dans tous les autres essais à propos desquels ils indiquent la grandeur de la concentration ionique, la réaction a été faiblement alcaline, et dans ces conditions on obtient tout au plus une coagulation incomplète; en outre, le chauffage provoque sûrement une décomposition plus ou moins profonde de la protéine.

Pour obtenir des éclaircissements bien exacts sur la question qui nous occupe, il faut opérer la coagulation d'une manière telle qu'elle devienne aussi complète que possible, ce qui veut dire avant tout qu'elle doit se faire à la concentration ionique la plus avantageuse. Ce sont quelques séries d'expériences effectuées de cette façon sur le sérum et sur le blanc d'œuf de poule qui

[1]) Biochem. Zeitschr. **18**, 336 (1909).

font l'objet principal de la présente étude. Ainsi que nous l'exposons dans la partie expérimentale, nous avons d'abord pour chaque série déterminé par des essais préliminaires la quantité d'acide (chlorhydrique, lactique, acétique ou sulfurique) que, dans les conditions expérimentales choisies (concentration protéique, teneur en sel, *etc.*), il fallait utiliser pour assurer au liquide à coaguler la concentration ionique la plus propice. Conséquemment, dans notre expérience principale, la coagulation s'opérait précisément dans les conditions optimales, et aussi bien avant qu'après la coagulation, nous faisions la mesure de la concentration ionique.

Ces expériences ont montré que la coagulation totale de la protéine par chauffage donne toujours lieu à une diminution de la concentration du milieu en ions hydrogène.

De plus, elles nous ont fait constater que la grandeur de la modification que subit la concentration des ions hydrogène dépend de la nature de l'acidifiant: d'une manière générale, plus l'acidifiant est fort, plus la modification est grande.

Ainsi qu'on le verra dans la partie expérimentale, ces faits trouvent leur explication simple et naturelle à l'aide de la conception ci-dessus indiquée de la concentration optimale en ions hyrogène comme la concentration ionique que la protéine pure donne à la solution. En conséquence, la modification de la réaction sera simplement à considérer comme une modification de concentration qu'éprouve la teneur en matière protéine de la solution (voir d'ailleurs p. 34).

Dans la partie expérimentale qui va suivre, nous ferons au chapitre A l'exposé de quelques séries d'expériences qui montrent le procédé que nous avons suivi en vue de trouver les conditions les plus favorables pour la coagulation des solutions de sérum et de blanc d'œuf de poule.

Dans le chapitre B nous tâcherons d'approfondir la question relative à la modification subie par la concentration ionique à la suite de la coagulation.

Dans un troisième et dernier chapitre nous signalons, en nous appuyant sur quelques séries d'expériences, un phénomène étrange et que, à notre connaissance, on n'a pas encore observé jusqu'à présent dans la coagulation par chauffage d'une solution

de blanc d'œuf: Alors que le sérum a été coagulé en totalité déjà après un quart d'heure ou une demi-heure de chauffage dans l'eau bouillante, il en est tout autrement des solutions de blanc d'œuf, même dans les conditions les plus favorables à la coagulation. Lorsque la première coagulation abondante a eu lieu, un chauffage ultérieur du liquide renfermant le dépôt coagulé a pour effet que ce dernier s'accroit de plus en plus pour atteindre un maximum au bout de quelques heures, après quoi l'action décomposante et dissolvante de la liqueur sur la matière coagulée prend le dessus au point que, en continuant le chauffage, on verra augmenter de nouveau la proportion des composés azotés non-coagulés.

Si, au contraire, après une demi-heure de chauffage dans l'eau bouillante, on sépare par filtration le dépôt coagulé, la liqueur filtrée soumise à un chauffage prolongé restera parfaitement limpide, ou peu s'en faut.

A. Les conditions optimales de coagulation.

La question de ce qu'on est convenu d'appeler l'azote restant ou reste azoté du sang, est un des problèmes pour la solution desquels une méthode réellement irréprochable d'élimination des matières protéiques coagulables est de la première importance. Cette question, qui est si importante pour la compréhension de tout ce qui rapporte à la transposition de l'azote dans l'organisme, a été l'objet de nombreuses recherches; mais les résultats auxquels on est arrivé sont souvent contradictoires. Cela tient en grande partie aux difficultés considérables que présente la séparation quantitative des composants azotés coagulables du sang d'avec ceux qui ne se laissent pas coaguler. Ce n'est pas ici le lieu de passer en revue ces recherches, de même qu'il nous entrainerait trop loin de faire une description détaillée des procédés utilisés par les divers savants pour la séparation des composants coagulables du sang. Du reste, c'est d'autant moins nécessaire que H. Hohlweg et H. Meyer ont donné un aperçu de toute cette question dans l'introduction d'un beau travail: »Quantitative Untersuchungen über den Reststickstoff des Blutes«, qu'ils ont fait paraître il y a deux ans environ[1]).

[1]) Beitr. zur chem. Physiol. und Pathol. **11**, 381 (1908).

Le procédé employé par Hohlweg et Meyer, procédé dont ils ont démontré la précision au moyen d'un certain nombre de déterminations vérificatrices, peut être résumé comme suit: On ajoute au sérum un mélange de parties égales d'acide acétique à 1 pour cent et d'une solution à 5 pour cent de phosphate potassique primaire jusqu'à réaction acide envers le tournesol, tandis que vis-à-vis du papier de Congo elle doit être encore neutre; ensuite on étend avec de l'eau et une solution saturée de sel marin, après quoi on fait coaguler. Ces chimistes ont habituellement utilisé, pour 50 cc. de sérum, 50 cc. du mélange d'acide acétique et de phosphate potassique, et ils ont dilué avec 300 cc. d'eau et 400 cc. de solution saturée de sel marin.

Cette méthode est entachée des inconvénients généralement inhérents aux méthodes de coagulation, inconvénients qui découlent de la forte proportion de sel que renferme la solution et, d'autre part, de la difficulté de déterminer avec précision la dose optimale de l'acidifiant. A la vérité, le choix de ce dernier a été déterminé de telle façon qu'un léger excès ne puisse probablement avoir d'effet appréciable; mais, d'un autre côté, la détermination de la quantité à ajouter est loin d'être rigoureuse. Ce fait est relevé par les auteurs eux-mêmes (à l'endroit cité, p. 387): «Der Spielraum vom Auftreten der sauren Reaktion gegen Lackmus bis zum Auftreten einer Kongoreaktion ist allerdings ein ziemlich grosser, somit die Bezeichnung 'gegen Lackmus sauer, gegen Kongo noch neutral' keine sehr scharfe.»

Pour mieux expliquer cet état de choses, nous allons indiquer les détails d'une série d'expériences que nous avons faite sur le sérum du sang de cheval:

Dans 20 cc. de ce dernier nous avons fait tomber, en agitant, le mélange recommandé par Hohlweg et Meyer d'acide acétique à 1 pour cent et de solution à 5 pourcent de phosphate de potassium.

Après addition de 3 cc., la réaction sur le papier de tournesol était faiblement acide, tandis qu'avec 4 cc. elle était nettement acide, avec 6 cc. fortement acide et avec 10 cc. très fortement acide; mais même après addition de 50 cc. du mélange d'acide acétique et de phosphate, le sérum n'a pas donné de réaction acide sur le papier Congo. Du reste, il n'y a pas à s'en étonner, si l'on songe que le Congo est tout à fait impropre à servir d'indicateur en présence de protéines naturelles[1]); mais cela montre

[1]) Voir ces mêmes Comptes-rendus **8**, 82 (1909).

en même temps le peu de sécurité que présente la détermination de la quantité optimale de l'acidifiant.

Nous avons alors procédé à une série d'expériences de coagulation en observant très exactement les conditions de dilution recommandées par Hohlweg et Meyer. Dans des matras en verre d'Iena nous avons mis 20 cc. de sérum, *a* cc. du mélange acidifiant, (140 ÷ *a*) cc. d'eau et 160 cc. de solution saturée de chlorure de sodium. Après avoir fait coaguler pendant 15 minutes dans de l'eau bouillante, nous avons placé les matras dans de l'eau froide jusqu'au lendemain; alors nous avons filtré pour déterminer dans 200 cc. de la liqueur filtrée la quantité d'azote totale d'après la méthode de Kjeldahl.

Pour ce qui concerne la proportion (*a* cc.) du mélange d'acide acétique et de phosphate, nous nous sommes basés, d'une part, sur le fait signalé plus haut: qu'une addition de 10 cc. du mélange était suffisante pour assurer au sérum une très forte réaction acide sur le tournesol, et, d'autre part, sur l'indication de Hohlweg et Meyer que des volumes égaux de sérum et du mélange acidifiant convenaient ordinairement. Étant donné que le chauffage de tous les matras avait lieu simultanément et dans des conditions identiques, l'évaporation de l'eau au cours de la coagulation ne peut avoir aucun effet sur le résultat de la comparaison; une pesée de contrôle montra d'ailleurs que le poids de l'eau évaporée dans chaque essai était d'environ 4 gr.

Pour les résultats de ces expériences nous renvoyons à notre tableau I, p. 9. En calculant les chiffres portés à la dernière colonne, nous avons tenu compte de l'eau évaporée; par contre, pas plus ici que dans nos essais ultérieurs, nous n'avons tenu compte du volume du dépôt coagulé.

Il ressort de ce tableau, premièrement, que 10 cc. du mélange d'acide acétique et de phosphate (Expérience n° 1) sont loin d'être suffisants pour donner les conditions optimales de coagulation, malgré le fait indiqué ci-dessus que cette addition donne au sérum une très forte réaction acide envers le tournesol. Bien plus, même la proportion choisie par Hohlweg et Meyer: volumes égaux de sérum et du mélange acidifiant (Expérience n° 5), ne fait pas obtenir les conditions les plus convenables: on n'y arrive qu'en employant 23 cc. du mélange acidifiant (Expérience n° 7).

La seconde question à résoudre était celle-ci: Est-il possible sans addition de sel, seulement au moyen d'une acidification

Tableau I. *Coagulation de sérum d'après Hohlweg et Meyer.*

20 cc. de sérum : 233^{mgr}.0 d'azote total.

N° de l'expérience	Dose employée (*a*) du mélange acidifiant (en cc.)	Proportion d'azote dans les substances non-coagulées	
		dans 200 cc. de la liqueur filtrée (en mgr.)	dans 20 cc. de sérum (en mgr.)
1	10	5.59	8.83
2	14	4.79	7.57
3	17	4.84	7.65
4	19	4.76	7.52
5	20	4.73	7.47
6	21	4.56	7.20
7	23	3.95	6.24
8	25	4.19	6.62

convenable suivie d'un chauffage, de réaliser une séparation aussi complète des constituants azotés coagulables du sérum que par le procédé de Hohlweg et Meyer? Afin de trouver une réponse à cette question, nous avons effectué trois séries d'expériences sur le même genre de sérum que celui employé lors de la coagulation d'après ces deux savants.

Dans une séries de flacons jaugés de 100 cc. de capacité nous avons introduit dans chacun 20 cc. de sérum, *a* cc. d'acide (chlorhydrique, sulfurique ou acétique) normal au $^1/_{10}$ et $(55 \div a)$ cc. d'eau. Après avoir chauffé exactement pendant 15 minutes au bain d'eau bouillante, nous avons placé les flacons dans de l'eau froide jusqu'au lendemain; alors nous avons versé de l'eau jusqu'au trait, et après avoir bien agité à plusieurs reprises, puis laissé au repos pendant 3 à 4 heures, nous avons soumis la liqueur à la filtration, pour doser dans 50 cc. l'azote total d'après Kjeldahl. Les résultats se trouvent consignés au tableau II (p. 10).

Ce tableau montre d'abord que, pour la teneur en composés non-coagulés, il est possible d'arriver, par simple acidification et coagulation, à des chiffres pratiquement aussi petits que ceux que donne le procédé de Hohlweg et Meyer; bien plus, surtout lorsqu'on se sert d'acide acétique, la zone optimale parait être plus large qu'elle ne l'est dans l'expérience faite suivant les in-

Tableau II. *Coagulation de sérum après addition d'acide chlorhydrique, sulfurique ou acétique.*

20 cc. de sérum : 233^{mgr}.0 d'azote total.

N° de l'expérience	Proportion (*a*) d'acide chlorhydrique, sulfurique ou acétique en cc. de solution norm. au $^1/_{10}$	Proportion d'azote des matières non-coagulées					
		dans 50 cc. de la liqueur filtrée après acidification par acide			dans 20 cc. de sérum après acidification par acide		
		chlorhydrique mgr.	sulfurique mgr.	acétique mgr.	chlorhydrique mgr.	sulfurique mgr.	acétique mgr.
9	7	3.75	3.92	4.05	7.50	7.84	8.10
10	8	3.25	3.38	3.54	6.50	6.76	7.08
11	9	3.20	3.26	3.23	6.40	6.52	6.46
12	10	3.16	3.27	3.18	6.32	6.54	6.36
13	11	3.46	3.35	3.15	6.92	6.70	6.30
14	12	C.i.*	3.35	3.23	—	6.70	6.46
15	13	»	3.46	3.31	—	6.92	6.62
16	14	»	3.98	3.45	—	7.96	6.90

* Coagulation incomplète.

dications de ces deux chimistes. Dans les deux cas les conditions optimales demandent à être déterminées par des essais.

Dans les expériences relatées ici, la dose d'acide optimale est à peu près la même pour tous les trois acides; nous croyons devoir signaler ce fait parce que, dans des conditions d'ailleurs égales, nous avons ordinairement trouvé la dose optimale un peu plus grande pour l'acide acétique que pour les acides chlorhydrique et sulfurique.

Enfin le tableau fait ressortir très nettement la différence entre l'action d'un acide fort et celle d'un acide faible (respectivement de l'acide chlorhydrique et de l'acide acétique; l'acide sulfurique se place d'une façon naturelle entre les deux). Lorsqu'on se sert de l'acide chlorhydrique, un déficit d'acidifiant — expériences n°s 9 et 10 — donne lieu à une erreur moindre que lors de l'emploi de l'acide acétique. S'il y a un excès d'acidifiant — expériences n°s 14, 15 et 16 —, c'est l'inverse qui a lieu: tandis que même un excès très minime d'acide chlorhydrique provoque une coagulation pour ainsi dire visiblement incomplète, un excès de plusieurs centimètres cubes d'acide acétique n'entraine qu'une

erreur insignifiante dans la coagulation. De nombreux essais nous ont donné la confirmation de ce fait facilement explicable, mais en même temps important et intéressant.

De la manière ci-dessus décrite nous avons constamment déterminé la proportion d'acide la plus avantageuse pour la coagulation. Dans le chapitre suivant on trouvera de nombreux exemples d'expériences de ce genre; nous nous bornerons ici a en citer deux séries exécutées sur le blanc d'œuf de poule, dans le but de mettre en évidence l'influence qu'exerce une addition de sel marin sur l'allure de la coagulation.

Pour chaque essai nous avons mis en œuvre 50 cc. d'une solution à env. 4 % de blanc d'œuf de poule brut[1]), a cc. d'acide chlorhydrique norm. au $^1/_{10}$; de plus, dans la première série $(20 \div a)$ cc. d'eau et dans la 2e série 5 cc. de solution 2-n. de chlorure de sodium + $(15 \div a)$ cc. d'eau. Le volume de la liqueur a coaguler était donc dans l'une et l'autre série 70 cc. La coagulation était effectuée en 15 minutes dans le bain d'eau bouillante; d'ailleurs les conditions expérimentales étaient les mêmes que celles indiquées plus haut.

Nous avons rassemblé les résultats dans le tableau III.

Tableau III.

Coagulation d'une solution de blanc d'œuf de poule après acidulation par l'acide chlorhydrique sans ou avec addition de chlorure de sodium.

50 cc. de solution de blanc d'œuf : 261 mgr. d'azote total.

Première série (sans sel)			Deuxième série (avec sel)		
No de l'expérience	Dose (a) d'acide chlorhydrique n. au $^1/_{10}$ en cc.	Azote total dans 50 cc. de liqueur filtrée en mgr.	No de l'expérience	Dose (a) d'acide chlorhydrique n. au $^1/_{10}$ en cc.	Azote total dans 50 cc. de liqueur filtrée en mgr.
17	9.0	14.58	24	9.0	16.80
18	9.5	13.54	25	9.5	16.50
19	10.0	12.21	26	10.0	16.38
20	10.5	11.95	27	10.5	16.20
21	11.0	12.51	28	11.0	16.10
22	11.5	13.76	29	11.5	16.13
23	12.0	14.69	30	12.0	16.08
—	—	—	31	12.5	16.28
—	—	—	32	13.0	16.33

[1]) Préparé de la façon habituelle (v. ces mêmes Comptes-rendus, **7**, 45 [1907].

Il ressort du tableau III:

1° que dans la première série le point optimal se trouve à une addition d'acide de 10cc.5 (essai n° 20), et que l'addition de sel le fait déplacer du côté acide, parce que dans la deuxième série la dose optimale d'acide doit être de 11cc.5 (essai n° 29). Des mesures électrométriques ont donné pour le mélange de l'essai n° 20 une concentration en ions hydrogène répondant à $p_H^+ = 4.65$, tandis que dans le cas de l'essai n° 29 on a eu $p_H^+ = 4.52$;

2° que la position du point optimal est beaucoup plus marquée dans la première série que dans la seconde; dans cette dernière il est plutôt question d'une zone optimale. L'addition de sel a donc pour effet que des écarts avec la proportion optimale d'acide ont une importance moindre. Cependant on remarque en même temps

3° que la proportion d'azote dans la liqueur filtrée est bien plus grande dans la seconde série que dans la première. Par conséquent, l'addition de sel a donné lieu à une coagulation moins complète ou, en tout cas, plus lente (comp. chapitre C).

B. Modification subie par la concentration ionique lors de la coagulation.

a. Dans l'introduction au présent mémoire nous avons résumé le mode opératoire adopté pour ces expériences, comme aussi les résultats obtenus. Pour faire mieux comprendre les détails de notre procédé, nous allons faire l'exposé d'une de ces expériences.

350 cc. d'une solution à env. 4 % de blanc d'œuf de poule cru sont additionnés de 10 cc. d'acide chlorhydrique normal, et du jour au lendemain on fait passer un courant d'hydrogène à travers le mélange afin d'en expulser l'acide carbonique. On prend une dose d'acide telle que la concentration en ions hydrogène — qui à la mesure électrométrique s'est trouvée répondre à $p_H^+ = 3.89$ — soit suffisamment grande pour que tout l'acide carbonique puisse réellement être chassé, mais de l'autre côté, pas assez grande pour que, en laissant au repos à la température ambiante, on ait à craindre une formation appréciable d'acidalbumine.

Pour la solution ainsi obtenue on détermine, de la manière expliquée dans le chapitre premier, les conditions les plus favo-

rables pour la coagulation: Dans un certain nombre de flacons jaugés de 100 cc. on introduit dans chacun 50 cc. de la solution de blanc d'œuf acidulée (renfermant de l'acide chlorhydrique correspondant à $13^{cc}.9$ d'acide décinormal), a cc. de solution d'hydroxyde de sodium norm. au $^1/_{10}$ et $(6 \div a)$ cc. d'eau, le volume de la liqueur à coaguler étant de 56 cc. dans cette expériences et les suivantes. Ensuite on fait coaguler pendant 15 minutes dans le bain d'eau bouillante, puis on fait refroidir dans de l'eau. Après repos jusqu'au lendemain, la solution est complétée avec de l'eau jusqu'au trait; on l'agite énergiquement a plusieurs reprises, puis l'abandonne à elle-même pendant 3 à 4 heures, pour faire le dosage de l'azote d'après Kjeldahl dans 50 cc. de la liqueur filtrée.

Les résultats se trouvent réunis dans le tableau IV.

Tableau IV. *Coagulation d'une solution de blanc d'œuf de poule après addition d'acide chlorhydrique.*

N° de l'expérience	Quantité (a) de NaOH au $^1/_{10}$ en cc.	Dose de HCl au $^1/_{10}$ ajoutée non neutralisée par NaOH $(13.9 \div a)$ en cc.	Proportion dans 50 cc. de la liqueur filtrée mgr.
1	4.6	9.3	13.45
2	4.1	9.8	11.53
3	3.6	10.3	12.15
4	3.1	10.8	14.12
5	2.6	11.3	Coagulation incomplète

Il appert de ce tableau que les conditions les plus favorables pour la coagulation se trouvent dans l'expérience n° 2. En conséquence, nous avons opéré notre expérience principale de la manière suivante: 700 cc. de la solution à env. 4 % de blanc d'œuf furent additionnés de 20 cc. d'acide chlorhydrique normal, puis on fit traverser du jour au lendemain le mélange par un courant d'hydrogène. La solution principale fut préparée en mélangeant ensemble

500 cc. de la solution acidulée de blanc d'œuf, traitée avec de l'hydrogène
41 » de lessive de soude norm. au $^1/_{10}$
19 » d'eau.

En tout 560 cc.

On fit coaguler 300 cc. de ce mélange en chauffant à l'eau bouillante pendant une demi-heure dans une fiole en verre d'Iéna munie d'un réfrigérant ascendant. La fiole fut pesée avant et après coagulation; la perte de poids ne s'élevait qu'à $0^{gr}.15$; pour la compenser, on ajouta après refroidissement 3 gouttes d'eau. Après des agitations répetées, on abandonna au repos jusqu'au lendemain, et alors on effectua la filtration.

La concentration en ions hydrogène a été mesurée électrométriquement par le procédé indiqué antérieurement[1]), tant dans la solution principale avant coagulation que dans la liqueur filtrée après coagulation; on a dosé d'après Kjeldahl la proportion d'azote de ces mêmes solutions.

La concentration ionique avant la coagulation répondait à $p_H^+ = 4.60$; dans la liqueur filtrée elle était de $p_H^+ = 5.21$.

50 cc. de la solution principale contenaient 249 mgr. N
50 » de la liqueur filtrée contenaient 19.75 mgr. N,

ce qui fait 7.93 % de l'azote total.

On remarquera que dans l'expérience n° 2, tableau IV, nous avons trouvé dans 50 cc. de liqueur filtrée — correspondant à 28 cc. de la solution principale — $11^{mgr}.53$ d'azote. D'après ce résultat, dans l'expérience principale où aucune dilution n'a eu lieu, on devait trouver dans 50 cc. de liqueur filtrée $11.53 \times \frac{50}{28} = 20^{mgr}.59$ d'azote; cependant on n'en a trouvé que $19^{mgr}.75$. Ainsi que des essais de contrôle directs nous l'ont montré, cela ne provient pas de ce que l'eau ajoutée dans les essais préliminaires redissolve une partie de la matière déjà coagulée, mais bien de la durée différente de la coagulation. Dans tous les essais préliminaires nous n'avons chauffé que pendant 15 minutes, tandis que dans les expériences principales, a cause de la quantité plus grande de liquide, nous avons étendu le chauffage à une demi-heure.

Comme nous l'avons déjà dit dans l'introduction (v. p. 6), et comme nous allons en parler plus longuement dans le chapitre suivant, la durée du chauffage a son importance pour la coagulation du blanc d'œuf de poule, mais, par contre, elle n'en a aucune dans la coagulation du sérum. Pour toutes les expériences relatées dans la suite, un simple calcul démontrera l'exactitude de ce que nous venons d'avancer.

[1]) Ces mêmes Comptes-rendus **8**, 20 (1909).

Tableau V. *Coagulation de solution de blanc d'œuf de poule après addition d'acide sulfurique, lactique ou acétique.*

No de l'expérience	Dose d'acide **sulfurique** norm. au 1/10 non neutralisé par NaOH ($13.9 \div a$) en cc.	Azote dans 50 cc. de liqueur filtrée mgr.	No de l'expérience	Dose d'acide **lactique** norm. au 1/10 non neutralisé par NaOH ($12.5 \div a$) en cc.	Azote dans 50 cc. de liqueur filtrée mgr.	No de l'expérience	Dose d'acide **acétique** norm. au 1/10 non neutralisé par NaOH ($20.6 \div a$) en cc.	Azote dans 50 cc. de liqueur filtrée mgr.
6	7.8	15.24	11	8.0	12.18	18	16.6	10.77
7	8.8	14.14	12	9.0	11.08	19	17.6	10.21
8	9.3	13.87	13	9.5	10.13	20	18.6	10.25
9	9.8	13.88	14	10.0	10.03	21	19.6	10.20
10	10.8	14.05	15	10.5	10.25	22	20.6	10.56
—	—	—	16	11.0	10.95	—	—	—
—	—	—	17	12.0	11.75	—	—	—

En agissant toujours de la même manière que ci-dessus, mais en employant d'autres solutions de blanc d'œuf, nous avons entrepris des experiences analogues en acidulant par l'acide sulfurique, lactique ou acetique. On trouvera les résultats des essais préliminaires dans le tableau V (v. p. 15).

En nous basant sur ces essais préalables, nous avons alors effectue les experiences principales, que nous avons fait porter sur les solutions suivantes et qui ont donné les résultats que voici:

Acidulation par l'acide sulfurique.

A 700 cc. d'une solution à env. 4 % de blanc d'œuf on a ajoute 20 cc. d'acide sulfurique normal, et à travers le mélange ainsi obtenu on a fait passer un courant d'hydrogène.

La solution principale se composait de

500 cc. de la solution de blanc d'œuf acidulée
43cc.5 de lessive de soude norm. au 1/10 } Point optimal choisi entre les essais nos 3 et 9.
16cc.5 d'eau }

En tout 560 cc.

Avant la coagulation: $p_H^+ = 4.68$.
Apres » » : $p_H^+ = 5.51$.

50 cc. de la solution principale contenaient 244 mgr. N,
50 - de la liqueur filtrée contenaient 23mgr.9 N
(= 9.80 % de l'azote total).

Acidulation par l'acide lactique.

A 630 cc. de solution à env. 4 % de blanc d'œuf on a ajouté 90 cc. d'acide lactique norm. au 1/5; on a fait passer dans ce mélange un courant d'hydrogène.

Composants de la solution principale:

500 cc. de la solution acide de blanc d'œuf
25 » de lessive n. au 1/10 de soude } Point optimal comme dans l'essai no 14.
35 » d'eau }

En tout 560 cc.

Avant la coagulation: $p_H^+ = 4.69$.
Apres » » : $p_H^+ = 4.92$.

50 cc. de la solution principale contenaient 210 mgr. N,
50 » de la liqueur filtrée contenaient 15mgr.3 N
(= 7.29 % de l'azote total).

Acidulation par l'acide acétique.

A 500 cc. de solution à env. 4 % de blanc d'œuf on a ajouté 130 cc. d'acide acétique norm. au $^1/_5$; on a fait passer de l'hydrogène dans le mélange.

Composants de la solution principale:

500 cc. de la solution acide de blanc d'œuf
20 » de lessive norm. au $^1/_{10}$ de soude } Point optimal comme dans l'essai n° 20.
40 » d'eau }

En tout 560 cc.

Avant la coagulation: $p_H^+ = 4.69$.
Après » » : $p_H^+ = 4.76$.

50 cc. de la solution principale contenaient 199 mgr. N.
50 » de la liqueur filtrée contenaient $15^{mgr}.9$ N,
(= 7.99 % de l'azote total).

Nous sommes arrivés à des résultats tout à fait semblables même lorsque les essais préliminaires étaient opérés sans hydrogénation préalable en liqueur acide, et que lors de l'hydrogénation de la solution principale il n'y avait que la proportion d'acide optimale trouvée par les essais préliminaires. Nous allons citer un exemple où l'acidulation se faisait au moyen de l'acide chlorhydrique:

Pour les essais préliminaires nous avons mis en œuvre 50 cc. de solution à env. 4 % de blanc d'œuf non-hydrogéné, *a* cc. d'acide chlorhydrique norm. au $^1/_{10}$ et $(20 \div a)$ cc. d'eau. Le volume de la solution à coaguler était donc de 70 cc.; on a complété comme d'habitude, jusqu'à 100 cc., puis dosé l'azote dans 50 cc. de la liqueur filtrée. Le tableau VI indique les résultats de ces essais préalables.

Tableau VI. *Coagulation d'une solution de blanc d'œuf de poule après addition d'acide chlorhydrique.*

N° de l'expérience	Dose d'acide chlorhydrique norm. au $^1/_{10}$ en cc.	Dose d'eau additionnée en cc.	Azote total dans 50 cc. de la liqueur filtrée mgr.
23	9.5	10.5	12.45
24	10.0	10.0	11.58
25	10.5	9.5	11.69
26	11.0	9.0	12.93
27	11.5	8.5	13.85
28	12.0	8.0	14.55

L'expérience principale portait sur la solution suivante:

500 cc. de solution à env. 4 % de blanc d'œuf,
100 » d'acide chlorhydrique n. au $^1/_{10}$ } Point optimal comme
100 » d'eau } dans l'essai n° 24.

Le mélange fut hydrogéné du jour au lendemain et puis filtré.

Avant la coagulation: $p_H^+ = 4.69$.
Après » » : $p_H^+ = 5.36$.

50 cc. de la solution principale contenaient 189 mgr. N.
50 » de la liqueur filtrée contenaient $14^{mgr.}.1$ N,
(= 7.46 % de l'azote total).

b. Expériences sur des solutions de blanc d'œuf dépourvues par dialyse des sels y contenus. Une solution à env. 4 % de blanc d'œuf, ayant été aiguisée respectivement par de l'acide chlorhydrique, sulfurique et acétique, fut soumise dans le courant d'un mois environ à une dialyse soignée dans de l'eau fréquemment renouvelée. On se servit de papier parchemin comme membrane, et afin d'obvier à la putréfaction on laissa la dialyse s'opérer en glacière, de même que la solution fut maintenue saturée et recouverte de toluène. La dialyse terminée, on ne put plus déceler d'acide sulfurique dans la portion qui en avait été additionnée, et dans celle aiguisée par l'acide chlorhydrique on pouvait à peine constater la présence d'une trace minime de ce dernier. Après des filtrages répétés, le dernier reste de toluène fut chassé des solutions au moyen d'un courant d'hydrogène, après quoi elles servirent pour des expériences analogues à celles relatées précédemment.

Pour les essais préliminaires nous avons mis en œuvre 50 cc. de solution de blanc d'œuf, a cc. d'acide (chlorhydrique, sulfurique ou acétique) norm. au $^1/_{10}$ et $(15 \div a)$ cc. d'eau. Le volume de la solution à coaguler était donc de 65 cc.; de même que dans les autres essais préliminaires, le chauffage dura 15 minutes, tandis que dans les expériences principales sa durée était d'une demi-heure. On étendit comme d'habitude à 100 cc., et on dosa l'azote dans 50 cc. de la liqueur filtrée.

Les résultats de ces essais préalables se trouvent résumés au tableau VII (p. 19).

Nous basant sur ces essais, nous avons procédé aux expériences principales.

Tableau VII.

Coagulation d'une solution, pauvre en sels, de blanc d'œuf de poule, après addition d'acide chlorhydrique, sulfurique ou acétique.

N° de l'expérience	Dose d'acide **chlorhydrique** 0.1-n en cc.	Azote dans 50 cc. de liqueur filtrée mgr.	Remarques	N° de l'expérience	Dose d'acide **sulfurique** 0.1-n en cc.	Azote dans 50 cc. de liqueur filtrée mgr.	N° de l'expérience	Dose d'acide **acétique** 0.1-n en cc.	Azote dans 50 cc. de liqueur filtrée mgr.
29	2.0	—	Coagulation très incomplète à cause d'une décomposition due à l'action de l'acide	37	3.5	Filtrage très lent	44	5.0	7.67
30	1.7	7.35	Bon filtrage	38	3.0	9.35	45	4.5	7.25
31	1.4	6.95	Filtrage excellent et rapide	39	2.5	8.77	46	4.0	7.25
32	1.1	8.66	Filtrage passablement bon	40	2.0	8.70	47	3.5	7.33
33	0.8	9.15	Filtrage lent	41	1.5	9.87	48	3.0	7.77
34	0.5	—	Filtrage très lent	42	1.0	10.65	49	2.5	8.55
35	0.2	—	Filtrage presque impossible	43	0.5	Coagulation nulle	50	2.0	9.50
36	0.0	—		—	—	—	51	1.0	10.97

Acidulation par l'acide chlorhydrique.

La solution principale se composait de

500 cc. de solution, pauvre en sels, de blanc d'œuf
14 » d'acide chlorhydrique norm. au $^1/_{10}$ } Point optimal à
136 » d'eau } l'essai n° 31.

En tout 650 cc.

Hydrogénation de la solution du jour au lendemain.

Avant la coagulation: $p_H^+ = 4.82$.
Après » » : $p_H^+ = 5.45$.

50 cc. de la solution principale contenaient 126 mgr. N.
50 » de la liqueur filtrée contenaient $9^{mgr}.27$ N,
(= 7.36 % d'azote total).

Acidulation par l'acide sulfurique.

La solution principale se composait de

500 cc. de solution de blanc d'œuf pauvre en sels
$22^{cc}.5$ d'acide sulfurique norm. au $^1/_{10}$ } Point optimal choisi entre
$127^{cc}.5$ d'eau } les essais n°s 39 et 40.

En tout 650 cc.

Hydrogénation du jour au lendemain.

Avant la coagulation: $p_H^+ = 4.71$.
Après » » : $p_H^+ = 5.25$.

50 cc. de la solution principale contenaient 142 mgr. N.
50 » de la liqueur filtrée contenaient $11^{mgr}.45$ N,
(= 8.06 % d'azote total).

Acidulation par l'acide acétique.

Composants de la solution principale:

500 cc. de solution, pauvre en sels, de blanc d'œuf,
40 » d'acide acétique norm. au $^1/_{10}$ } Point optimal à
110 » d'eau } l'essai n° 46.

En tout 650 cc.

Hydrogénation du jour au lendemain.

Avant la coagulation: $p_H^+ = 4.73$.
Après » » : $p_H^+ = 4.78$.

50 cc. de la solution principale contenaient 135 mgr. N.
50 » de la liqueur filtrée contenaient $9^{mgr}.46$ N,
(= 7.01 % d'azote total).

Les dosages d'azote effectués dans les solutions principales montrent qu'il s'agit ici de solutions de blanc d'œuf un peu moins fortes que dans nos expériences précédentes; mais même en tenant compte de ce fait, il ressort clairement du tableau VII combien sont petites les doses d'acide qui suffisent pour donner les conditions de coagulation optimales pour les solutions de blanc d'œuf pauvres en sels. On peut voir également — les essais portant sur l'acide chlorhydrique le montrent naturellement d'une façon particulièrement nette — l'importance que peuvent avoir pour l'allure de la coagulation, même de très légères modifications de la dose d'acide ajoutée (v. p. 40).

c. Expériences sur des solutions de blanc d'œuf de concentrations diverses. Trois séries d'expériences ont été exécutées. Dans tous les essais préalables le volume de la liqueur à coaguler était de 70 cc.; mais dans la première série le mélange était composé de

50 cc. de solution à env. 4 % de blanc d'œuf,
a cc. d'acide chlorhydrique normal au $^1/_{10}$, et
$(20 \div a)$ cc. d'eau;

dans la deuxième série, de

25 cc. de solution à env. 4 % de blanc d'œuf,
a cc. d'acide chlorhydrique 0.02 n., et
$(45 \div a)$ cc. d'eau — et

dans la troisième série, de

10 cc. de solution à env. 4 % de blanc d'œuf,
a cc. d'acide chlorhydrique 0.02 n., et
$(60 \div a)$ cc. d'eau.

D'ailleurs le procédé était le même qu'à l'ordinaire; durée de coagulation: 15 minutes. Le tableau VIII (v. p. 22) résume les résultats.

Ces essais préliminaires ont servi de base aux expériences principales.

La solution principale de la première expérience se composait de

250 cc. de solution à env. 4 % de blanc d'œuf
52cc.5 d'acide chlorhydrique norm. au $^1/_{10}$ } Point optimal à l'essai n° 55.
47cc.5 d'eau }

En tout 350 cc.

Tableau VIII. *Coagulation de blanc d'œuf de poule de concentrations différentes; acidulation à l'acide chlorhydrique.*

50 cc. de solution de blanc d'œuf			25 cc. de solution de blanc d'œuf			10 cc. de solution de blanc d'œuf		
N° de l'expérience	Dose (*a*) d'acide chlorhydrique 0.1 n en cc.	Azote dans 50 cc. de liqueur filtrée mgr.	N° de l'expérience	Dose (*a*) d'acide chlorhydrique 0.02 n en cc.	Azote dans 50 cc. de liqueur filtrée mgr.	N° de l'expérience	Dose (*a*) d'acide chlorhydrique 0.02 n en cc.	Azote dans 50 cc. de liqueur filtrée mgr.
52	9.0	14.58	59	20.00	7.92	65	8.0	3.26
53	9.5	13.54	60	22.50	7.34	66	8.5	3.15
54	10.0	12.21	61	23.75	6.72	67	9.0	2.98
55	10.5	11.05	62	25.00	6.59	68	9.5	2.85
56	11.0	12.51	63	26.25	6.93	69	10.0	2.96
57	11.5	13.76	64	27.50	7.29	70	10.5	3.33
58	12.0	14.69		–	–	—	—	—

Hydrogénation du jour au lendemain; durée de coagulation: une demi-heure.

Avant la coagulation: $p_H^+ = 4.65$.
Après » » : $p_H^+ = 5.32$.

50 cc. de la solution principale contenaient 186 mgr. N.
50 » de la liqueur filtrée contenaient $14^{mgr}.38$ N,
(= 7.73 % de l'azote total).

Dans la deuxième expérience les composants de la solution principale étaient les suivants:

100 cc. de solution à env. 4 % de blanc d'œuf
20 » d'acide chlorhydrique norm. au 1/10 } Point optimal à l'essai n° 62.
160 » d'eau }

En tout 280 cc.

Hydrogénation et coagulation comme ci-dessus.

Avant la coagulation: $p_H^+ = 4.72$.
Après » » : $p_H^+ = 5.41$.

50 cc. de la solution principale contenaient $93^{mgr}.2$ N.
30 » de la liqueur filtrée contenaient $7^{mgr}.98$ N,
(= 8.56 % de l'azote total).

Composants de la solution principale dans la troisième expérience:

50 cc. de solution à env. 4 % de blanc d'œuf
$47^{cc}.5$ d'acide chlorhydrique 0.02 n. } Point optimal à l'essai n° 68.
$252^{cc}.5$ d'eau }

En tout 350 cc.

Hydrogénation et coagulation comme précédemment.

Avant la coagulation: $p_H^+ = 4.94$.
Après » : $p_H^+ = 6.31$.

50 cc. de la solution principale contenaient $37^{mgr}.3$ N.
50 » de la liqueur filtrée contenaient $3^{mgr}.98$ N,
(= 10.67 % de l'azote total).

Il ressort soit du tableau VIII, soit des résultats obtenus par les expériences principales:

1° que la dose optimale d'acide n'est pas tout à fait proportionnelle à la quantité de blanc d'œuf employée, mais qu'elle croît un peu plus fortement que la concentration de la matière proteique;

2° conformément à ces résultats, la concentration en ions hydrogène la plus favorable pour la coagulation est plus grande pour les solutions de blanc d'œuf plus fortes que pour les solutions faibles, ce qui revient à dire que p_H^+ est moindre pour celles-là que pour celles-ci (v. p. 40).

3° La quantité de composés azotés non-coagulés n'augmente pas tout à fait proportionnellement à la concentration de la solution de blanc d'œuf: elle est relativement le plus forte dans les solutions faibles.

d. Expériences sur le sérum de sang de cheval. Pour terminer, nous allons citer deux séries expérimentales pour lesquelles nous avons employé du sérum de sang de cheval. Dans la première série nous nous sommes servis d'un sérum légèrement coloré par l'hémoglobine, et comme acidifiant nous avons utilisé l'acide chlorhydrique; la seconde série a porté sur un sérum d'une couleur jaune pur et acidulé par l'acide acétique. Pour les essais préliminaires nous avons mis en œuvre pour l'une et l'autre série 40 cc. de sérum, *a* cc. d'acide chlorhydrique ou acétique norm. au $^1/_5$ et $(30 \div a)$ cc. d'eau. Le volume de la liqueur à coaguler était donc 70 cc.; d'ailleurs le procédé était le même que plus haut. Le tableau IX contient les résultats de ces essais préalables.

Tableau IX. *Coagulation de sérum de sang de cheval additionné d'acide chlorhydrique ou d'acide acétique.*

N° de l'expérience	Dose d'acide **chlorhydrique** norm. au $^1/_5$ en cc.	Proportion d'azote dans 50 cc. de la liqueur filtrée mgr.	N° de l'expérience	Dose d'acide **acétique** norm. au $^1/_5$ en cc.	Proportion d'azote dans 50 cc. de la liqueur filtrée mgr.
71	6	12.97	78	12	6.10
72	7	10.80	79	14	5.90
73	8	8.78	80	16	5.92
74	9	8.05	81	18	5.91
75	10	7.77	82	20	5.97
76	11	7.83	83	22	6.10
77	12	8.07	84	24	6.24

En nous fondant sur les résultats de ces derniers, nous avons procédé aux expériences principales.

Acidulation par l'acide chlorhydrique.

La solution principale se composait de

200 cc. de sérum
52cc.5 d'acide chlorhydrique norm. au 1/5 } Point optimal choisi intermédiaire entre les essais nos 75 et 7[illegible].
97cc.5 d'eau

En tout 350 cc.

Hydrogénation de la solution du jour au lendemain.

Avant la coagulation: $p_H^+ = 4.66$.
Après » » : $p_H^+ = 5.25$.

50 cc. de la solution principale contenaient 326 mgr. N.
50 » de la liqueur filtrée contenaient 10mgr.8 N,
(= 3.31 % de l'azote total).

Acidulation par l'acide acétique.

La solution principale se composait de

250 cc. de sérum
106 » d'acide acétique norm. au 1/5 } Point optimal choisi entre les essais nos 80 et 81.
81 » d'eau

En tout 437 cc.

La solution fut hydrogénée du jour au lendemain.

Avant la coagulation: $p_H^+ = 4.68$.
Après » » : $p_H^+ = 4.80$.

50 cc. de la solution principale contenaient 284 mgr. N.
50 » de la liqueur filtrée contenaient 8mgr.6 N,
(= 3.03 % de l'azote total).

e. Les résultats de toutes les expériences relatées dans le présent chapitre se trouvent réunis dans le tableau X (p. 26).

Les valeurs de p_H^+ indiquées dans la troisième colonne de ce tableau nous apprennent que la concentration en ions hydrogène la plus avantageuse pour la coagulation est passablement constante et notablement plus grande que celle qui, d'après les recherches de L. Michaelis, P. Rona et B. Mostynski (v. p. 3), correspond au point isoélectrique de l'albumine de sérum. En effet, dans le

Tableau X. *Tableau synoptique des modifications subies lors de la coagulation par la concentration en ions hydrogène.*

Solution protéique employée	Acidifiant	Concentration en ions hydrogène avant coagulation p_H^+	Concentration en ions hydrogène après coagulation p_H^+	Proportion d'azote en milligrammes dans 50 cc. de solution avant coagulation a	Proportion d'azote en milligrammes dans 50 cc. de liqueur filtrée après coagulation b	b exprimé en pourcentage de a	Remarques
Solution (non dialysée) de blanc d'œuf de poule	Ac. chlorh.	4.60	5.21	249.0	19.75	7.93	Hydrogénée après addition d'un excès d'acide.
» » » » »	»	4.69	5.36	189.0	14.10	7.46	Hydrogénée après addition de la dose d'acide optimale.
» » » » »	»	4.65	5.32	186.0	14.38	7.73	De même (ces trois solutions avaient été préparées au moyen d'une même solution de blanc d'œuf.
» » » » »	»	4.72	5.41	93.2	7.98	8.56	
» » » » »	»	4.94	6.31	37.3	3.98	10.67	
dialysée	»	4.82	5.45	126.0	9.27	7.36	Hydrogénée après addition de la dose d'acide optimale.
non dialysée	Ac. sulfur.	4.68	5.51	244.0	23.90	9.80	Hydrogénée après addition d'acide en excès.
dialysée	»	4.71	5.25	142.0	11.45	8.06	Hydrogénée après addition de la dose optimale d'acide.
non dialysée	Ac. lact.	4.69	4.92	210.0	15.30	7.29	Hydrogénée après addition d'acide en excès.
» »	Ac. acét.	4.69	4.76	199.0	15.90	7.99	De même.
dialysée	»	4.73	4.78	135.0	9.46	7.01	Hydrogénée après addition de la dose d'acide optimale.
Sérum de sang de cheval rougeâtre, non dialysé	Ac. chlorh.	4.66	5.25	326.0	10.80	3.31	De même.
jaune.	Ac. acét.	4.68	4.80	284.0	8.60	3.03	De même.

dernier travail de Michaelis et Rona[1]) cette dernière concentration est évaluée à 0.3×10^{-5}, répondant à $p_H^+ = 5.52$ (voir d'ailleurs p. 39).

Ainsi qu'il a déjà été dit dans notre introduction (v. p. 3), la valeur de p_H^+ varie légèrement avec la concentration de la solution protéique, p_H^+ étant d'autant plus fort que la solution est plus faible; cette variation ressort d'une manière particulièrement claire des trois expériences portant sur des solutions de blanc d'œuf différant seulement par leur degré de dilution. De plus, la valeur optimale de p_H^+ a généralement été trouvée un peu plus élevée pour les solutions dialysées, et par suite pauvres en sels que pour celles qui n'ont pas subi la dialyse; toutefois, la différence n'est pas si forte qu'elle ne puisse s'expliquer par la plus faible teneur en protéine des solutions dialysées. Cependant, si l'on tient également compte des expériences exposées à la fin du chapitre précédent (v. p. 11), il ne peut guère y avoir de doute qu'une addition de sel ne tende à déplacer un peu du côté acide la concentration ionique la plus favorable pour la coagulation, de telle sorte que p_H^+ se montre un peu plus bas pour les solutions riches en sels que pour celles qui en contiennent peu.

Ces divergences entre les valeurs optimales de p_H^+ trouvées sont, à vrai dire, bien légères, mais cependant elles ne proviennent certainement pas d'erreurs expérimentales. Il ne faut pas oublier, en effet, que le mesurage de la concentration ionique a été fait à une température de 18^0, tandis que la coagulation l'a été à 100^0. Étant donné que la modification subie par la concentration ionique par suite du chauffage de 18^0 à 100^0, dépend très vraisemblablement autant de la concentration de la solution protéique que de sa teneur en sels, nous sommes ici en présence d'une source d'erreur sur l'importance de laquelle nos expériences ne fournissent aucun éclaircissement. Nous sommes pourtant d'avis que lesdites variations de la valeur optimale de p_H^+ ne sont pas dues à une source d'erreur inhérente à la méthode, mais que — comme nous en parlerons dans la suite — elles sont essentiellement attribuables à la concentration de la solution protéique (v. p. 34).

En ce qui concerne l'azote restant dans la liqueur filtrée après coagulation, il est évident que la quantité absolue en dépend de la proportion d'azote totale qu'elle renfermait avant la coagulation; on remarque cependant que, relativement, la quantité demeure à peu près invariable dans toutes nous expériences sur le blanc d'œf de poule (durée de coagulation: une

[1]) Biochem. Zeitschr. **27**, 38 (1910).

demi-heure), à savoir 7 à 8 pour cent de l'azote total (tableau X, avant-dernière colonne). Ce n'est que dans les expériences où l'acidulation est effectuée au moyen de l'acide sulfurique ou dans celles portant sur une solution protéique très faible, que la proportion centésimale de matière azotée non-coagulée se montre légèrement plus forte. Les solutions dialysées ont toujours donné une proportion de matière azotée non-coagulée inférieure à celle des solutions non-dialysées; ce résultat n'est certainement dû qu'en partie seulement à ce que, au cours de la dialyse, il y a eu élimination de composés azotés non coagulables: il provient sûrement plutôt de ce fait (comp. les essais p. 11) que la coagulation est moins parfaite ou en tout cas plus lente dans les solutions contenant beaucoup de sels que dans celles qui n'en renferment que peu.

Dans le sérum la proportion de composés azotés non-coagulables est moindre que dans le blanc d'œuf de poule.

Enfin, pour ce qui concerne la modification que subit la concentration en ions hydrogène par suite de la coagulation, une comparaison des valeurs de p_H^+ de la troisième colonne du tableau avec celles de la quatrième colonne, montre d'une façon très nette que dans les expériences où l'acidulation est effectuée au moyen des acides forts que sont l'acide chlorhydrique ou l'acide sulfurique, la modification est bien plus marquée que dans celles où ce sont les acides lactique ou acétique qui entrent en jeu.

Nous avons cherché à expliquer ce fait remarquable en faisant la supposition que par la coagulation il ne se précipite pas de la protéine pure, mais par contre un sel formé de celle-ci et de l'acide présent. Si cette supposition était exacte, il serait naturel de s'attendre à ce que cette formation de sel se fît dans une étendue d'autant plus grande que l'acidifiant aura été plus fort. Cependant, ainsi qu'il ressort de l'expérience décrite ci-dessous, expérience où l'on a employé de l'acide chlorhydrique comme acidifiant, nous n'avons pas pu démontrer expérimentalement l'exactitude de notre hypothèse: cette expérience montre, au contraire, que la coagulation d'une solution dialysée de blanc d'œuf pauvre en sel, après acidification préalable avec la dose optimale d'acide chlorhydrique, n'enlève pas à la solution des quantités mesurables de cet acide. Par con-

séquent, d'accord avec les idées émises par Michaelis, Rona et Mostynski, ce n'est que la protéine elle-même qui est précipitée lors de la coagulation.

Pour l'expérience en question nous avons mis en œuvre une solution de blanc d'œuf de poule purifiée par une dialyse prolongée et qui contenait 372 mgr. d'azote par 50 cc. Après avoir déterminé de la manière habituelle la dose optimale d'acide chlorhydrique, nous avons préparé la solution principale comme suit:

300 cc. de solution de blanc d'œuf dialysée
30cc.5 d'acide chlorhydrique au 1/10,
89cc.5 d'eau

En tout 420 cc.

La solution a été coagulée par chauffage dans de l'eau bouillante dans un flacon en verre d'Iéna muni d'un réfrigérant ascendant. On a chauffé pendant une heure afin d'obtenir un grand changement de concentration en ions hydrogène et, d'accord avec cela, on a trouvé:

avant la coagulation: $p_H^+ = 4.79$,
après » » : $p_H^+ = 6.02$.

A 100 cc. de la liqueur filtrée après quelque temps de repos, on a ajouté 5 cc. d'une solution, 0.4-n., d'hydroxyde de baryum, après quoi la solution alcaline ayant été évaporée à siccité dans une capsule en platine, le résidu fut incinéré à une température aussi basse que possible. Après avoir traité à l'eau les cendres, on a titré d'après Volhard la teneur en chlorure de la solution ainsi obtenue. Dans 100 cc. de celle-ci on a trouvé après filtration une proportion de chlorure correspondant

a) à 7cc.19 d'acide chlorhydrique norm. au 1/10
b) à 7cc.20 » » » » »

tandis que la quantité calculée est de

$\frac{30.5 \times 100}{420} = 7^{cc}.26$ d'acide chlorhydrique norm. au 1/10

(on n'a pas tenu compte du volume du dépôt).

En vue d'un essai de contrôle, on a chauffé pendant une heure dans un flacon en verre d'Iéna, de la manière décrite ci-dessus, un mélange de

30cc.5 d'acide chlorhydrique norm. au 1/10 et
389cc.5 d'eau

En tout 420 cc.

et ensuite, après avoir fait évaporer 100 cc. de ce mélange en présence de 5 cc. de solution 0.4-n. d'hydroxyde de baryum, on a incinéré le résidu au moyen du même bec de gaz et pendant le même temps que lors de l'expérience principale. Les cendres se sont trouvées contenir une proportion de chlorure correspondant

a) à 7cc.20 d'acide chlorhydrique norm. au 1/10
b) à 7cc.22 » » » » »

donc la même quantité que celle trouvée dans 100 cc. de la liqueur filtrée de l'expérience principale.

Il y a lieu de faire remarquer qu'il n'est pas possible de doser avec exactitude d'après Volhard la teneur en chlorure du filtratum sans faire une incinération préalable, parce que même par précipitation en liqueur assez fortement nitrique une partie du chlorure d'argent reste en solution à l'état colloïdal. Pour cette même raison on ne peut pas être sûr qu'une solution protéique soit absolument exempte de chlore, même si après acidification par l'acide nitrique elle ne se trouble pas au contact du nitrate d'argent. Enfin, il ne faut pas perdre de vue qu'en présence d'hydroxyde de baryum, l'incinération des charbons azotés est peut être susceptible de donner naissence à des cyanures.

En conséquence, nous avons fait évaporer, en présence de 5 cc. de solution 0.4-n. d'hydroxyde de baryum, 50 cc. de la solution de blanc d'œuf primitive utilisée pour la préparation de la solution principale et qui, soumise à l'épreuve usuelle à l'acide nitrique et au nitrate d'argent, s'est montrée parfaitement exempte de chlorure; ensuite le résidu fut calciné et traité de la même manière dans la même capsule et avec le même bec de gaz que lors des expériences relatées plus haut. Dans l'extrait aqueux des cendres, l'acide nitrique et le nitrate d'argent provoquèrent un trouble léger, mais bien perceptible. Nous n'avons pu établir si ce trouble provenait du cyanure ou du chlorure; mais il est certain que la quantité de ces corps était tellement insignifiante qu'une si faible formation de cyanure ou une si minime teneur en chlorure ne peuvent avoir aucune influence sur la force probante de nos expériences.

Dans le travail mentionné déjà dans notre introduction[1]), Michaelis et Rona insistent à plusieurs reprises sur ce fait qu'un dégagement d'acide carbonique au cours de la coagulation donnera lieu à une modification de réaction vers le côté alcalin. Nous aussi avons tout naturellement tenu compte de ce fait et, conséquemment, nous avons opéré avec des solutions qui, ayant subi une action prolongée d'un courant d'hydrogène en milieu acide, devaient être considérées comme étant exemptes d'acide carbonique. Quoi qu'il en soit, nous sommes d'avis que la modification provoquée par la coagulation dans la concentration ionique ne peut point s'expliquer de cette manière. En effet, s'il en était ainsi, on devrait alors s'attendre à ce que la quantité d'acide carbonique expulsé dépendit de la grandeur de la concentration en ions hydrogène, mais non pas de la nature de l'acidifiant. De même, à notre avis, la possibilité est absolument exclue que nos solutions de blanc d'œuf dialysées auraient contenu des proportions d'acide

[1] Biochem. Zeitsch. **18**. 336 (1909).

carbonique ou de carbonates si considérables qu'elles auraient pu avoir de l'influence sous ce rapport.

S'il pouvait être question d'un dégagement d'acide carbonique, il devrait par conséquent provenir d'une décomposition de la molécule protéique ayant lieu lors de la coagulation; on pourrait se figurer une liaison de l'acide carbonique telle que celle des composés carbaminés étudiés par M. Siegfried[1]); mais cette hypothèse ne trouve également pas d'appui dans quelques essais exécutés dans le but d'éclaircir ce point, et dont nous allons faire l'exposé. Ils ont été faits par M. S. Palitzsch d'une façon telle que l'acide carbonique auquel la coagulation pouvrait donner naissance pût être recueilli dans une lessive de baryte, et ils ont permis d'établir qu'au cours de la coagulation il ne se développe pas du tout d'acide carbonique en quantité mesurable.

Pour le premier essai on a mis en œuvre 700 cc. de solution à env. 4 % de blanc d'œuf naturel préparé de la façon habituelle et à laquelle les sels n'avaient pas été enlevés par dialyse. On y ajouta 20 cc. d'acide chlorhydrique normal, et le mélange ainsi obtenu ayant été débarrassé de son acide carbonique au moyen d'un courant d'hydrogène qu'on y fit passer du jour au lendemain, accusa par mesure électrométrique une concentration ionique répondant à $p_H^+ = 3.87$.

Après avoir déterminé par le procédé habituel la concentration ionique la plus avantageuse pour la coagulation, on a préparé la solution principale de

500 cc. de la solution acide de blanc d'œuf hydrogénée
42 cc. d'hydroxyde de sodium norm. au $^1/_{10}$
18 cc. d'eau.

Mesuré par voie électrométrique, ce mélange donna $p_H^+ = 4.70$.

La coagulation fut effectuée dans un ballon d'un litre muni, d'un côté, d'un tube allant jusqu'au fond et destiné à amener de l'air dépourvu d'acide carbonique et, de l'autre, d'un réfrigérant ascendant communiquant avec une série de barboteurs renfermant une solution d'hydroxyde de baryum additionnée de chlorure de baryum. Après avoir rempli au préalable l'appareil entier avec de l'air exempt d'acide carbonique, on a introduit dans les barboteurs la solution limpide d'hydroxyde de baryum, et enfin on a mis dans le ballon 300 cc. du mélange ci-dessus ($p_H^+ = 4.70$).

On a alors fait passer pendant une heure et demie de l'air exempt d'acide carbonique au travers du mélange et de l'appareil entier, sans que la solution barytique en ait été troublée. Ensuite on a chauffé pendant 1 heure le ballon dans de l'eau bouillante en se-

[1]) Ergebnisse der Physiologie **IX**, 334 (1910).

couant bien à plusieurs reprises et en le faisant traverser lentement par de l'air débarrassé de son acide carbonique; puis on a fait refroidir le ballon en continuant durant 2 heures encore le courant d'air. Ce procédé eut pour résultat de rendre la solution du premier barboteur très légèrement, mais distinctement trouble.

Afin de déterminer la quantité d'acide carbonique correspondant à ce trouble, on a ajouté d'abord un peu de phénolphtaléine, et ensuite avec précaution de l'acide chlorhydrique norm. au $^1/_{10}$ jusqu'à ce que la teinte rouge pût justement se distinguer encore. Dans le mélange ainsi obtenu la teneur en carbonate fut dosée en ajoutant $5^{cc}.00$ d'acide chlorhydrique norm. au $^1/_5$, puis expulsant l'acide carbonique par ébullition, enfin refroidissant et titrant en retour avec une solution d'hydroxyde sodique norm. au $^1/_5$; de cette dernière il a fallu $4^{cc}.80$. Il appert donc que la quantité d'acide carbonique dégagé au cours de la coagulation correspond, tout au plus, à $(5.00 \div 4.80 =)$ $0^{cc}.20$ de solution norm. au $^1/_5$ d'hydroxyde de sodium.

Quelques essais où l'on se servit d'acide lactique ou d'acide acétique pour l'acidulation de la solution de blanc d'œuf, donnèrent un résultat tout à fait analogue, et enfin dans un essai témoin où la solution protéique fut remplacée par de l'eau distillée et fraîchement bouillie, on constata un dégagement d'acide carbonique du même ordre de grandeur. On peut en tirer la conclusion que les quantités de carbonate barytique très faibles formées dans les essais faits avec les solutions protéiques ne proviennent pas — du moins pas d'une façon appréciable — d'un dégagement d'acide carbonique lors de la coagulation, mais bien de sources d'erreur inhérentes au dispositif expérimental, et surtout d'un apport d'acide carbonique atmosphérique.

Après avoir laissé en repos jusqu'au lendemain dans une glacière le ballon renfermant la matière protéique coagulée, on ajouta la quantité d'eau évaporée lors de la coagulation, quantité qui par pesée du ballon avant et après chauffage fut trouvée de $0^{gr}.25$ à $0^{gr}.4$. La concentration ionique fut mesurée électrométriquement dans la liqueur bien agitée et puis filtrée. On a également dosé sa teneur en azote tant avant qu'après la coagulation. Les valeurs trouvées, que nous avons rassemblées dans le tableau XI, montrent que les modifications subies par la concentration en ions hydrogène lors de la coagulation répondent tout à fait aux résultats de nos expériences précédemment décrites; il en est de même de la proportion d'azote de la liqueur filtrée.

En ce qui concerne les causes qui ont amené, lors de la coagulation, la modification de concentration ionique dont nous nous occupons ici, il paraît naturel d'en chercher une dans la décomposition mentionnée au chapitre suivant et à laquelle donne lieu un chauffage trop prolongé d'une solution protéique. Par conséquent, il serait tout naturel d'admettre que même dans des conditions optimales de coagulation et en chauf-

Tableau XI.

Solution utilisée pour l'essai	Cc. d'acide chlorhydrique au $^1/_5$ correspondant au carbonate barytique formé x	Concentration en ions hydrogène avant coagulation p_H^+	Concentration en ions hydrogène après coagulation p_H^+	Quantité d'azote en mgr. dans 50 cc. de solution avant coagulation a	Quantité d'azote en mgr. dans 50 cc. de liqueur filtrée après coagulation b	b exprimé en pourcentage de a
Solut. de blanc d'œuf acidulée par l'acide chlorhydrique . . .	0.20	4.70	6.01	241.9	17.80	7.36
Solut. de blanc d'œuf acidulée par l'acide lactique	0.25	4.69	4.94	218.0	17.00	7.80
Solut. de blanc d'œuf acidulée par l'acide acétique.	0.18	4.68	4.74	221.0	16.88	7.64
Eau distillée	0.20	—	—	—	—	—

fant pendant le temps optimal, il pourrait se produire une scission ayant pour effet un changement de réaction. Cependant, pour y trouver l'explication de la dépendance de ce dernier de la nature de l'acidifiant, il faudrait admettre que le genre ou l'étendue de la scission étaient dépendants non seulement de la grandeur de la concentration en ions hydrogène, mais aussi de la nature de l'acidifiant, ce qui nous semble assez peu vraisemblable. Aussi, quelques essais relatés ci-dessous et dans lesquels l'étendue de la décomposition protéique au cours de la coagulation était mesurée au moyen de titrages au formol[1] des liqueurs filtrées après coagulation, ont-ils démontré que même après une heure de chauffe dans de l'eau bouillante, la décomposition est extrêmement faible, et, d'autre part, qu'elle est tout à fait indépendante de la nature de l'acidifiant.

Nous avons fait trois essais de coagulation en partant d'une même solution de blanc d'œuf et employant comme acidifiant, respectivement, l'acide chlorhydrique, l'acide lactique ou l'acide acétique. On a procédé exactement de la même manière que précédemment (v. p. 12), en ajoutant un excès de l'acidifiant afin d'assurer l'élimination complète de l'acide carbonique, après quoi on a fait passer

[1]) Ces mêmes Comptes-rendus **7**, 1 (1907).

un courant d'hydrogène du jour au lendemain. Il a alors été déterminé par des essais préalables combien d'hydroxyde de sodium il fallait ajouter pour réaliser les conditions optimales de coagulation dans lesquelles les expériences principales étaient effectuées. La durée de coagulation était d'une heure. Outre les déterminations habituelles de la concentration en ions hydrogène et de la teneur en azote aussi bien dans la solution non-coagulée que dans la liqueur filtrée après coagulation, on a établi encore la dose de solution norm. au $^1/_5$ d'hydroxyde de sodium qu'exigeraient 30 cc. respectivement de la solution non-coagulée et de la liqueur filtrée

1° pour donner une réaction neutre sur du papier de tournesol très sensible[1]), et

2° pour donner avec la phénolphtaléine une teinte faiblement rouge.

Enfin on a déterminé

3° la proportion d'azote pouvant être titré au formol; à cet effet, on a titré en présence de la phénolphtaléine jusqu'à coloration fortement rouge, en prenant la neutralité au tournesol comme point de départ pour le calcul. Dans ces conditions, la présence de l'acide acétique, acide faible, dans un de ces essais aura pour conséquence que dans cet essai les titrages au formol donneront des résultats un peu trop hauts[2]).

Les résultats se trouvent réunis dans le tableau XII.

Le tableau XII, colonnes 6 et 7, fait voir que — comme on pouvait le prévoir — la quantité d'azote titrable au formol est la même dans toutes les trois solutions non-coagulées (nous avons signalé plus haut que le résultat de l'essai à l'acide acétique doit être un peu trop élevé), et les colonnes 11 et 12 montrent qu'il en est de même pour les liqueurs filtrées. Les chiffres dont il s'agit dans ce dernier cas sont si faibles qu'on doit considérer comme un pur hasard qu'ils concordent si bien entre eux; l'influence de l'acide acétique dans le dernier essai ne se remarque pas.

Les expériences faites jusqu'à ce jour ne nous permettent pas encore de nous prononcer avec certitude sur la question de savoir pourquoi le changement de réaction dépend de la nature de l'acidifiant; mais nous considérons que le fait doit être conçu essentiellement comme un phénomène de *dilution*. façon de voir qui trouve son appui dans les chiffres donnés dans le tableau XII et qui, d'ailleurs, fournissent l'explication de certains faits mentionnés dans ce qui précède.

Dans le tableau XII, colonne 2, nous avons indiqué la dose de l'acidifiant, chiffres qui peuvent facilement être calculés au

[1]) Préparé d'après les indications de V. Henriques et S. P. L. Sørensen, Zeitschr. für physiol. Chemie **64**, 133 (1909).

[2]) Comparez: V. Henriques et S. P. L. Sørensen: Zeitschr. für physiol. Chemie **63**, 33 (1909).

Tableau XII.

Acidifiant	30 cc. de la solution non coagulée						30 cc. de la liqueur filtrée					Concentration en ions hydrogène	
	contenaient *a* cc. de l'acidifiant (acide norm. au 1/5)	exigeaient pour devenir neutre vis-à-vis du papier de tournesol, *b* cc. de lessive de soude norm. au 1/5	exigeaient pour prendre une coloration rouge faible avec la phénolphtaléine, en tout *c* cc. de lessive de soude norm. au 1/5	contenaient *d* milligrammes d'azote	contenaient *e* milligrammes d'azote titrable au formol	*e* exprimé en pourcentage de *d*	exigeaient pour devenir neutre vis-à-vis du papier de tournesol *f* cc. de lessive de soude norm. au 1/5	exigeaient pour prendre une coloration rouge faible avec la phénolphtaléine, *g* cc. de lessive de soude norm. au 1/5	contenaient *h* milligrammes d'azote	contenaient *i* milligrammes d'azote titrable au formol	*i* exprimé en pourcentage de *h*	avant la coagulation	après la coagulation
	a	b	c	d	e		f	g	h	i		p_H^+	p_H^+
Acide chlorhydrique	2.60	1.42	1.60	140.9	6.50	4.61	0.10	0.12	10.49	0.39	3.72	4.68	5.71
» lactique . . .	2.76	1.59	1.80	130.8	6.30	4.82	0.39	0.41	10.20	0.45	4.41	4.69	4.94
» acétique . . .	6.88	5.56	5.92	132.6	6.72	5.07	4.10	4.22	10.13	0.42	4.15	4.68	4.74

moyen des proportions de solution de blanc d'œuf, d'acide, de lessive de soude et d'eau utilisées pour la préparation des solutions principales. Pour ce qui concerne l'expérience à l'acide chlorhydrique, on voit (colonne 2) que 30 cc. de solution contiennent $2^{cc}.60$ d'acide chlorhydrique norm. au $^1/_5$ non neutralisé par l'hydroxyde sodique ajouté. Or, pour produire avec la phénolphtaléine une coloration faiblement rouge, il faut $1^{cc}.60$ de lessive de soude norm. au $^1/_5$ (colonne 4). Ceci pourrait faire croire que la neutralisation des sels de réaction alcaline (carbonates ou autres) faisant partie de la solution de blanc d'œuf avait demandé ($2.60 \div 1.60 =$) $1^{cc}.00$ d'acide chlorhydrique, alors que $1^{cc}.60$ d'acide se trouvait lié à la substance protéique, et la combinaison d'acide et de protéine aurait alors provoqué la réaction acide de la solution ($p_H^+ = 4.68$). Cependant il ne peut pas en être ainsi, car les expériences exposées plus haut (v. p. 29) ont démontré que par la coagulation il ne se précipite que la protéine et pas d'acide chlorhydrique, de sorte que ce dernier devait se retrouver dans la liqueur filtrée. Par conséquent, cette dernière devrait probablement avoir une réaction plus nettement acide que la solution non-coagulée, alors que notre essai montre que c'est l'inverse qui a eu lieu. De même, la liqueur filtrée devrait exiger une dose abondante d'hydroxyde de sodium pour donner avec la phénolphtaléine une coloration faiblement rouge; l'essai n'a demandé que $0^{cc}.12$ de solution d'hydroxyde sodique (tableau XII, colonne 9).

Les résultats auxquels nous sommes arrivés deviennent cependant facilement compréhensibles, si l'on admet que la quantité totale, ou presque totale, de l'acide chlorhydrique a été consommée pour la neutralisation des sels à réaction alcaline renfermés dans la solution protéique, et que la réaction acide de cette dernière provient essentiellement du caractère acide de la protéine pure. On sait que les substances protéiques aussi bien que leurs produits de décomposition, possèdent un caractère amphotère: additionnés d'acides ils présentent des propriétés basiques, tandis qu'une addition de bases les fait agir comme acides. Une solution aqueuse d'une protéine pure accusera un caractère quelque peu différent selon la nature de cette protéine. Pour ce qui regarde les protéines qu'on a autrefois considérées comme neutres, nous pouvons mettre en fait que,

même si le nombre des groupes basiques correspond à celui des groupes acides, les constantes de dissociation de ces derniers sont bien plus grandes que celles des groupes basiques, de sorte que des protéines telles que les albumines d'œuf et de sérum agissent d'une façon générale comme des acides faibles.

Il n'y a rien d'étonnant à ce que des solutions d'acides faibles renfermant des groupes légèrement basiques exigent de fortes quantités de base avant d'atteindre la neutralité au tournesol (1cc.42, colonne 3), et il est tout aussi peu étonnant qu'il faille une encore plus forte quantité de base pour provoquer avec la phénolphtaléine une coloration légèrement rouge (1cc.60, colonne 4). On a rencontré des faits tout à fait analogues à propos des acides aminés, des peptones, et d'une façon particulièrement marquée à propos de la glycylglycine, seul polypeptide qui ait été examiné jusqu'ici sous ce rapport[1]).

Étant donné que dans la coagulation il se précipite de beaucoup la plus grande partie de la protéine, c'est-à-dire de l'acide faible qui détermine la concentration en ions hydrogène de la solution, il est tout naturel que cette dernière diminue, bien que pas proportionnellement, avec la diminution de la teneur en azote. Dans l'expérience à l'acide chlorhydrique résumée au tableau XII, la quantité d'azote de la liqueur filtrée ne s'élève qu'à $^1/_{13}$ à $^1/_{14}$ de la quantité primitive, alors que la concentration en ions hydrogène est d'environ 10 fois plus petite que celle de la solution non-coagulée (p_H^+ est respectivement égal à 5.71 et à 4.68).

Nous nous rendons parfaitement compte que dans une solution protéique telle que celle sur laquelle nous avons opéré, il s'agit d'un mélange de plusieurs protéines et que la plus grande partie des corps azotés non-coagulables sont d'une tout autre nature (mucoïdes) que la protéine coagulable. Cependant, pour ce qui concerne les considérations ci-dessus énoncées, ce fait n'a guère d'importance, parce que toutes les protéines présentes semblent, aux points de vue considérés, se comporter d'une manière identique. La diminution que la coagulation produit dans la teneur en azote, s'accompagne d'une diminution correspondante de la teneur en azote titrable au formol, ainsi que de la quantité de lessive de soude exigée pour obtenir la neutralité au tournesol et la coloration rouge en présence de la phénolphtaléine.

Si maintenant nous passons à l'expérience où l'acide acétique

[1]) V. Henriques et S. P. L. Sørensen: Zeitschr. für physiol. Chemie **63**, 31 (1909).

a été mis en jeu, nous voyons que, pour déterminer la formation d'acetates normaux avec les carbonates contenus dans la solution protéique, il a fallu, de l'acide acétique ajouté (6cc.88; tableau XII, colonne 2), une quantité équivalente à la proportion d'acide chlorhydrique (2cc.60). Par suite, il reste (6.88 ÷ 2.60 =) 4cc.28 d'acide acetique norm. au $^1/_5$, qu'on retrouvera après coagulation dans la liqueur filtrée en la titrant jusqu'à coloration faiblement rouge avec la phenolphtaleine (trouvé: 4cc.22, colonne 9; la titration jusqu'à réaction neutre au tournesol d'acides faibles tels que l'acide acetique donne, pour des raisons facilement compréhensibles, des résultats trop bas). Pareillement, la solution non-coagulée titrée jusqu'à coloration légèrement rouge avec la phénolphtaleine demande la quantité de lessive de soude (4cc.28) équivalente à l'excès d'acide acétique + celle exigée pour provoquer le changement de réaction de la protéine (1cc.60), en tout 5cc.88 (trouvé: 5cc.92, colonne 4).

De plus, on comprend facilement que pour donner à la solution protéique une concentration en ions hydrogène répondant à $p_H^+ = 4.68$, il est nécessaire d'ajouter une plus grande portion d'acide acétique que d'acide chlorhydrique. En effet, tandis que les chlorures qui prennent naissance accusent une réaction neutre et, de ce fait, exigent une trace fort minime d'excès d'acide chlorhydrique pour donner avec la protéine légèrement acide la concentration ionique optimale souvent mentionnée, les acétates, eux, en raison de leur scission hydrolytique, montrent une réaction fortement alcaline, et ce n'est qu'un mélange d'acétate et d'acide acétique — ce dernier en quantité abondante — qui avec la protéine fournira la concentration ionique optimale voulue. Ce mélange d'acétate et d'acide acétique fait alors office de «tampon»[1]) dans la coagulation, de telle sorte que la modification que subit la concentration en ions hydrogène par suite de la coagulation de la protéine ne se remarque que très faiblement.

Quant à notre expérience à l'acide lactique, elle donne lieu a des considérations et des calculs analogues; seulement cet acide est un acidifiant beaucoup plus fort que l'acide acétique, ce qui a pour effet que l'excès nécessaire en acide lactique est bien minime (2.76 ÷ 2.60 = 0cc.16). Par suite, la fonction de tampon

[1]) S. P. L. Sørensen: Ces mêmes Comptes-rendus **8**, 54 (1909).

exercée dans la coagulation par le mélange de lactate et d'acide lactique libre est moins marquée, et il se produit un changement de réaction bien distinct dans la direction alcaline, bien que d'une façon beaucoup moins prononcée que dans l'expérience à l'acide chlorhydrique.

En considérant ainsi la modification de la concentration ionique qui se produit dans la coagulation comme étant due à une diminution de concentration de la matière protéique, on comprendra facilement la corrélation ci-dessus indiquée (voir tableau X et p. 25) entre la concentration ionique optimale pour la coagulation et la concentration protéique. Si, en effet, on se souvient que seul le corps protéique et non pas un sel dudit corps se sépare lors de la coagulation, il y a lieu de s'attendre à trouver les conditions les plus favorables pour la coagulation de la protéine amphotère lorsqu'il n'y a d'excès ni d'acide ni de base avec lequel la protéine pourrait former un sel. Si maintenant — comme c'est le cas dans tous ceux parmis ces essais où l'acide chlorhydrique a servi comme acidifiant — il n'est question que d'acides forts et de bases fortes, la solution ne contiendra, dans ces conditions optimales de coagulation, que des sels neutres et une ou plusieurs protéines, dont la concentration déterminera la concentration ionique. En conséquence, la concentration optimale en ions hydrogène sera d'autant plus forte — et le p_H^+ correspondant d'autant plus faible — que la concentration de la solution protéique est plus grande.

Ainsi que nous l'avons déjà vu plus haut (p. 27), Michaelis et Rona ont trouvé que le *point isoélectrique* de l'albumine de sérum est situé aux environs de 0.3×10^{-5} (correspondant à $p_H^+ = 5.52$), donc à une concentration en ions hydrogène notablement moins élevée que la concentration optimale trouvée par nous. Il se peut que cette divergence trouve son explication dans le fait que Michaelis et Rona ont ordinairement opéré sur des protéines dénaturées et que, autant qu'on peut le voir par leurs indications, ils n'ont employé que des solutions ou des suspensions protéiques beaucoup plus faibles que celles utilisées dans nos expériences.

Il a également été signalé dans ce qui précède (p. 27) qu'une addition de sel semble modifier un peu la concentration ionique optimale dans la direction acide, fait qui, d'accord avec

ce que nous avons dit ci-dessus, s'explique peut-être par cet autre fait établi par Sv. Arrhenius[1]), à savoir que la présence de sels neutres a pour effet d'augmenter la constante de dissociation des acides faibles, au cas particulier de la protéine faisant fonction d'acide.

Pour être complets et afin d'éviter des malentendus, nous allons ajouter encore quelques remarques.

Lorsque la concentration ionique la plus avantageuse pour la coagulation coincide avec celle d'une solution aqueuse de la protéine pure, il est à présumer que, pour fournir des conditions optimales de coagulation, les solutions protéiques débarrassées de sels par dialyse ne demanderont pas d'addition d'acide. Cependant, lors des essais précédemment relatés sur des solutions de blanc d'œuf purifiées par dialyse, nous avons dû, pour obtenir les conditions favorisant le mieux la coagulation, employer une dose d'acide qui était loin d'être insignifiante. Ceci tient sûrement à ce que les solutions protéiques mises en œuvre n'étaient pas encore pures, car comme W. Pauli et R. Wagner[2]) l'ont signalé dernièrement, dans une dialyse de solution protéique renfermant des sels il est beaucoup plus facile d'éliminer les anions que les cations, parce que le caractère basique des substances protéiques est moins marqué que leur caractère acide. Il paraît donc vraisemblable, que nos solutions protéiques contenaient encore des substances basiques, et de pareilles solutions demandent naturellement une addition convenable d'acide pour atteindre la concentration ionique la plus favorable.

Nous devons dire encore quelques mots d'un autre fait mentionné plus haut (v. p. 23).

Dans nos trois séries d'expériences sur le blanc d'œuf de poule à des dilutions différentes, nous avons constaté que la quantité optimale d'acide n'était pas tout à fait proportionelle à la quantité utilisée de solution de blanc d'œuf (contrairement à ce qu'il fallait attendre, si le seul office de l'acide chlorhydrique consistait à neutraliser les carbonates contenus dans cette solution), mais qu'elle augmentait un peu plus que la concentration protéique. C'est ce qui semblerait indiquer que la concentration optimale des ions hydrogène ne dépend pas uniquement de la nature acide de la protéine même, mais qu'il faut encore un ex-

[1]) Zeitschr. für physik. Chemie **31**, 197 (1899).

[2]) Bioch. Zeitschr. **27**, 300 (1910).

cès — bien que peut-être extrêmement faible — d'acide chlorhydrique. Toutefois, l'effet en question est aussi susceptible d'une autre explication; car une teneur en sels d'acides faibles se manifestera précisément de cette manière et, d'autre part, une solution de blanc d'œuf non purifiée par dialyse renferme naturellement, entre autres, des phosphates.

Nous ne regardons cependant pas la question ici discutée comme définitivement résolue; c'est pourquoi, dans ce qui précède, nous nous sommes toujours exprimés avec quelque réserve et que nous nous bornerons à tirer de nos expériences les conclusions suivantes:

1° La concentration en ions hydrogène la plus favorable pour la coagulation d'une solution protéique pure, paraît être due essentiellement au caractère acide de la protéine elle-même, de sorte qu'elle sera fonction de la concentration de celle-ci.

2° La changement que subit la concentration ionique lors de la coagulation, provient d'une modification de la concentration protéique.

En tâchant d'approfondir davantage les questions qui font l'objet du présent travail, nous avons l'intention d'employer des solutions — autant que possible exemptes de sels — de substances protéiques aussi pures que possible, parce que dans ces circonstances les conditions expérimentales peuvent plus facilement être variées au gré de l'expérimentateur et que, de plus, on pourra plus facilement arriver à une vue d'ensemble des résultats obtenus. Cependant nous ne sommes pas sans nous rendre compte de ce fait que plus la solution protéique qu'on prépare est pure, et plus complètement on parvient à éliminer les corps agissant comme tampons, plus aussi ladite solution se montrera sensible vis-à-vis d'une addition d'acide ou de base, de sorte qu'il sera nécessaire d'employer des méthodes aussi rigoureusement exactes que possible[1]).

C. Influence de la durée de coagulation.

Lorsqu'on chauffe une matière protéique coagulée en liqueur aqueuse neutre, légèrement acide ou légèrement alcaline, il se

[1]) A ce propos nous pouvons attirer l'attention sur quelques remarques analogues et très justes par W. Pauli et R. Wagner dans la Bioch. Zeitschrift **27**, 302 (1910).

produit peu à peu une décomposition avec formation de composés azotés solubles. L'étendue de cette décomposition dépend de la température, de la durée de chauffe, de la concentration ionique du milieu, et probablement d'autres facteurs encore. Conséquemment il est de toute évidence que la durée de la coagulation est un des facteurs avec lesquels il faut compter lorsqu'il s'agit d'obtenir une séparation aussi complète que possible des corps azotés coagulables. Si la durée du chauffage est trop courte, il peut arriver que la coagulation ne soit pas totale, et si, par contre, on chauffe trop longtemqs, on court le risque de voir des composés azotés rentrer en dissolution.

Déjà dans l'introduction au présent mémoire nous avons signalé qu'après un quart d'heure ou une demi-heure de chauffe dans l'eau bouillante, la coagulation du sérum est totale, tandis que les solutions de blanc d'œuf se comportent d'une tout autre manière. Dans le présent chapitre nous allons exposer quelques séries expérimentales propres à mettre ce fait en évidence.

Dans le tableau XIII on trouve réunis les résultats de deux séries d'expériences sur du sérum assez fortement coloré par de l'hémoglobine. La première série porte sur un sérum contenant dans 20 cc. 234 mgr. d'azote et qui a été acidulé par l'acide sulfurique, tandis que le sérum employé dans la seconde série contient dans 20 cc. 202 mgr. d'azote et a été additionné d'acide acétique. Dans les deux séries on a mis en œuvre pour chaque expérience 20 cc. de sérum, a cc. d'acide normal au $^1/_{10}$ et $(55 \div a)$ cc. d'eau; d'ailleurs on a procédé comme d'habitude.

Il ressort de ce tableau qu'après une heure de chauffe la liqueur filtrée renferme une proportion d'azote légèrement plus forte qu'après un quart d'heure, et après une coagulation de trois heures les valeurs trouvées pour la quantité d'azote de la liqueur filtrée se trouvent être notablement trop élevées. Dans la série où l'acidifiant employé était l'acide acétique, le point optimal est situé à l'expérience n° 14 et ne paraît pas subir de modification par prolongation de la durée de coagulation. Dans la série à l'acide sulfurique le point optimal se trouve à l'expérience n° 4 quand on ne chauffe que pendant un quart d'heure, tandis que, si l'on fait durer le chauffage trois heures, ce point paraît être déplacé — très légèrement, il est vrai — dans la direction alcaline. Toutefois, il ne s'agit que de différences tellement faibles que le déplacement apparent et minime peut s'expliquer

Tableau XIII. *Coagulation du sérum dans des temps différents, après addition d'acides sulfurique ou acétique.*

N° de l'essai	Dose d'acide sulfurique (*a*) norm. au 1/10 en cc.	Proportion d'azote dans 50 cc. de liqueur filtrée après coagulation durant			N° de l'essai	Dose d'acide acétique (*a*) norm. au 1/10 en cc.	Proportion d'azote dans 50 cc. de liqueur filtrée après coagulation durant		
		1/4 d'heure mgr.	1 heure mgr.	3 heures mgr.			1/4 d'heure mgr.	1 heure mgr.	3 heures mgr.
1	7	4.51	4.66	5.35	9	7	5.40	6.12	8.15
2	8	3.99	—	4.79	10	8	4.28	4.78	6.19
3	9	3.86	3.92	4.62	11	9	3.70	3.91	4.72
4	10	3.84	3.91	4.73	12	10	3.39	3.50	4.12
5	11	3.89	4.02	4.89	13	11	3.21	3.31	3.99
6	12	4.00	4.22	5.26	14	12	3.22	3.31	4.00
7	13	4.20	4.62	5.78	15	13	3.22	3.30	3.98
8	14	4.60	5.00	6.27	16	14	3.31	3.38	4.11

par des erreurs expérimentales; nous signalons ce fait parce que les solutions de blanc d'œuf semblent pouvoir se comporter inversement (v. p. 47).

Comme la différence entre les durées de coagulation dans les deux séries expérimentales en question était assez forte, nous avons entrepris quelques essais complémentaires autant sur le sérum que sur des solutions de blanc d'œuf. Dans ces derniers essais la différence entre les durées de coagulation était de beaucoup moindre, et on a employé comme acidifiant la dose d'acide chlorhydrique favorisant le mieux la coagulation.

Dans la première série on a pris pour chaque essai:

40 cc. de sérum rouge (ayant une teneur en azote de 445 mgr.)
20 cc. d'acide chlorhydrique norm. au $^1/_{10}$
10 cc. d'eau

En tout 70 cc.

p_H^+ mesuré avant la coagulation fut trouvé égal à 4.66.

Dans la deuxième série chaque essai a porté sur

50 cc. de solution de blanc d'œuf (teneur en azote: 266 mgr.)
10 cc. d'acide chlorhydrique normal au $^1/_{10}$
10 cc. d'eau
70 cc.

Avant la coagulation on a trouvé p_H^+ égal à 4.69.

Dans la troisième série on a employé pour chaque essai:

50 cc. de solution de blanc d'œuf (teneur en azote: 271 mgr.)
10 cc. d'acide chlorhydrique norm. au $^1/_{10}$
10 cc. d'eau
70 cc.

Avant la coagulation $p_H^+ = 4.69$.

D'ailleurs nous avons opéré comme d'habitude; après avoir complété jusqu'à 100 cc., nous avons dosé l'azote dans 50 cc. de la liqueur filtrée. Les résultats ont été rassemblés dans le tableau XIV.

Il ressort de ce tableau que la durée optimale de la coagulation du sérum est d'environ une demi-heure, et que des varia-

Tableau XIV. *Coagulation de sérum et de solutions de blanc d'œuf dans des temps différents, après addition d'acide chlorhydrique.*

Première série (Sérum)			Deuxième série (Blanc d'œuf)			Troisième série (Blanc d'œuf)		
N° de l'essai	Durée de coagulation en minutes	Proportion d'azote dans 50 cc. de liqueur filtrée mgr.	N° de l'essai	Durée de coagulation en minutes	Proportion d'azote dans 50 cc. de liqueur filtrée mgr.	N° de l'essai	Durée de coagulation en minutes	Proportion d'azote dans 50 cc. de liqueur filtrée mgr.
17	5	12.20	25	5	16.65	33	10	13.12
18	10	6.95	26	10	—	34	20	10.38
19	15	6.50	27	15	12.25	35	30	9.13
20	20	6.48	28	20	11.12	36	45	8.30
21	30	6.45	29	25	10.52	37	60	7.88
22	60	6.51	30	30	10.02	38	90	7.25
23	90	6.70	31	40	9.60	39	120	7.00
24	120	7.00	32	60	8.63	40	180	6.26

tions entre un quart d'heure et une heure n'ont pas d'influence appreciable. Pour ce qui concerne les solutions de blanc d'œuf, on voit dans les deux séries la proportion d'azote non-coagulé diminuer à mesure que la durée de coagulation augmente.

Dans le but de mieux éclaircir la manière dont les solutions de blanc d'œuf se comportent à cet égard, nous avons, outre quelques essais préliminaires dont nous n'avons pas à nous occuper ici, effectué deux séries d'expériences et en consigné les résultats aux tableaux XV et XVI.

Tableau XV. *Coagulation de solutions de blanc d'œuf dans des temps différents et à des concentrations ioniques différentes.*

N° de l'essai	Dose d'acide chlorhydrique (*a*) norm. au $^1/_{10}$ en cc.	Proportion d'azote dans 50 cc. de liqueur filtrée après coagulation durant						
		$^1/_2$ heure mgr.	1 heure mgr.	2 heures mgr.	4 heures mgr.	6 heures mgr.	8 heures mgr.	10 heures mgr.
41	9.0	13.65	12.95	13.31	13.51	13.51	13.84	13.76
42	10.0	10.25	9.18	8.56	8.07	8.20	8.21	8.51
43	10.5	10.14	8.88	8.10	7.92	7.10	7.59	7.84
44	11.0	10.58	9.32	8.66	8.14	7.27	7.59	8.14
45	11.5	12.06	10.80	10.51	9.77	9.25	9.25	9.25
46	12.0	13.10	11.91	11.78	11.18	10.92	11.03	11.03

Tableau XVI. *Coagulation de solutions de blanc d'œuf dans des temps différents et à des concentrations ioniques différentes.*

N° de l'essai	Dose d'acide chlorhydrique (*a*) norm. au $^1/_{10}$ en cc.	Proportion d'azote dans 50 cc. de liqueur filtrée après coagulation durant				
		$^1/_4$ d'heure mgr.	1 heure mgr.	3 heures mgr.	8 heures mgr.	12 heures mgr.
47	9.0	15.71	15.43	15.47	15.90	16.80
48	10.0	13.39	11.17	10.30	10.83	11.84
49	10.5	12.47	9.69	8.88	9.24	10.32
50	11.0	13.10	9.47	8.44	8.21	9.03
51	11.5	14.28	10.66	9.84	9.03	9.18
52	12.0	15.50	12.20	10.92	10.55	10.40

Dans ces deux séries nous nous sommes servis de l'acide chlorhydrique comme acidifiant, et nous avons fait durer la coagulation des temps variables en employant 6 concentrations ioniques différentes. Pour chacune de ces expériences nous avons mis en œuvre 50 cc. de solutions de blanc d'œuf contenant dans la première série 266 mgr., dans la seconde 264 mgr. d'azote), a cc. d'acide chlorhydrique norm. au $^1/_{10}$ et $(20 \div a)$ cc. d'eau. D'ailleurs nous avons opéré comme d'habitude, en complétant jusqu'à 100 cc. et dosant l'azote dans 50 cc. de la liqueur filtrée.

Les tableaux XV et XVI, et surtout ce dernier, montrent nettement que la valeur minimale de la teneur en composés azotés non-coagulés — valeur qui dépend de la concentration ionique de la solution — est atteinte d'autant plus vite que la solution est moins acide. Dans l'expérience n° 47 la valeur minimale est atteinte déjà après 1 heure, dans les n°s 48 et 49 elle ne l'est qu'au bout de 3 heures, dans les n°s 50 et 51, seulement au bout de 8 heures, et enfin dans le n° 52 un chauffage de 12 heures donne la valeur minimale des corps azotés non-coagulés. A quoi cela tient-il? Nous ne saurions le dire avec certitude, mais il est probable que cela tient en partie à ce que, au cours de la coagulation, la concentration en ions hydrogène se trouve modifiée dans la direction alcaline (lors d'un chauffage prolongé, les alcalis du verre tendent à produire un effet semblable), et par suite les solutions les plus acides prennent peu à peu la concentration ionique optimale, tandis que les solutions moins acides deviennent petit à petit alcalines, ou en tout cas si faiblement acides qu'elles déterminent un commencement de décomposition et de dissolution des matières une fois coagulées.

Dans la première série expérimentale (tableau XV) la concentration ionique la plus avantageuse pour la coagulation est située à l'expérience n° 43 pour toutes les durées de coagulation. Dans la seconde série (tableau XVI) la concentration ionique optimale se trouve à l'expérience correspondante: n° 49, lorsque la durée de coagulation est d'un quart d'heure; mais pour les autres durées de coagulation, c'est la solution un peu plus acide n° 50 qui représente la concentration ionique optimale. Par conséquent, lorsque la durée de coagulation est prolongée, le point optimal semble pouvoir se déplacer un peu dans la direction acide comp. p. 44); ce phénomène aussi devient facilement compréhensible,

si l'on se souvient que la concentration ionique de la solution diminue au cours de la coagulation.

Nous avons préparé d'assez fortes quantités de solution correspondant aux mélanges employés aux expériences nos 49 et 50, et nous avons mesuré électrométriquement la concentration des ions hydrogène aussi bien dans les solutions avant coagulation que dans les liqueurs qui avaient été coagulées dans un temps déterminé, puis refroidies, étendues avec de l'eau dans la même proportion que dans les expériences nos 49 et 50, et enfin filtrées.

N° 49. Avant coagulation: $p_H^+ = 4.68$.
Après » en 1/4 d'heure $p_H^+ = 5.51$.
» » en 1 heure $p_H^+ = 5.62$.
N° 50. Avant coagulation: $p_H^+ = 4.50$.
Après » en 1 heure $p_H^+ = 5.33$.

Il appert de ces expériences que la séparation sous l'action de la chaleur du bain-marie des protéines coagulables d'une solution de blanc d'œuf, ou en tout cas de quelques-unes d'entre elles, demande un temps assez considérable et doit, par conséquent, être liée à des échanges chimiques ou des transpositions internes ayant lieu dans la molécule protéique. Nos expériences montrent une grande différence entre le sérum et les solutions de blanc d'œuf; mais il est fort probable qu'elle n'existe que dans la vitesse avec laquelle s'opère l'échange ou la transposition pendant la coagulation.

Dans les expériences que nous allons relater, il nous a été facile de démontrer que dans la coagulation de solutions de blanc d'œuf il s'agit bien de deux réactions différentes: à savoir d'une précipitation de protéines coagulables d'un côté, et, de l'autre, d'une redissolution de celles-ci due a une scission hydrolytique.

Pour toutes ces expériences nous avons utilisé des échantillons d'une même solution de blanc d'œuf acidulée au moyen d'un léger excès d'acide chlorhydrique, dépourvue d'acide carbonique au moyen d'un courant d'hydrogène et amenée à la concentration ionique optimale par addition de lessive de soude. Sur la solution ainsi obtenue on a prélevé des échantillons, qu'on a fait coaguler par chauffage dans l'eau bouillante pendant des temps inégaux et en agitant de temps en temps. Aussi bien dans la solution non-coagulée que dans la liqueur filtrée, on a déterminé la concentration des ions hydrogène, la teneur en azote, la quantité d'azote titrable au formol, et la consommation de lessive de soude norm. au $\frac{1}{5}$ exigée pour ob-

tenir la neutralité au tournesol ainsi que la coloration légèrement rouge en présence de la phénolphtaléine. Le tableau ci-aprés (XVII) contient les résultats de ces expériences.

Tableau XVII.

Durée de coagulation en heures	40 cc. de solution					Concentrations en ions hydrogène
	exigeaient pour devenir neutre vis-à-vis du papier de tournesol, *a* cc. de lessive de soude norm. au 1/5	exigeaient pour prendre une coloration rouge faible avec la phénolphtaléine, en tout, *b* cc. de lessive de soude norm. au 1/5	contenaient *c* milligrammes d'azote	contenaient *d* milligrammes d'azote titrable au formol	*d* exprimé en pourcentage de *c*	
	a	b	c	d		p_H^+
0	1.86	2.08	181.7	8.34	4.59	4.70
1	0.13	0.15	11.83	0.48	4.06	5.41
3	0.14	0.18	10.58	0.64	6.05	5.43
6	0.15	0.20	10.49	0.98	9.34	5.53
12	0.21	0.28	12.95	1.79	13.82	5.52
24	0.22	0.40	17.18	2.94	17.11	5.60

La quatrième colonne de ce tableau montre nettement que la coagulation n'est pas complète après 1 heure de chauffage; c'est seulement après 3 à 6 heures qu'on atteint la valeur minimale de la teneur en azote de la liqueur filtrée. Mais en même temps il ressort des deuxième, troisième et cinquième colonnes comment la quantité d'hydroxyde sodique nécessaire pour la neutralisation et, d'autre part, la proportion d'azote titrable au formole, augmentent régulièrement, que la coagulation ait été menée à bout ou non.

Ainsi qu'il appert de la sixième colonne du tableau, la quantité d'azote titrable au formol augmente beaucoup plus fortement que la quantité d'azote total, ce qui trouve son explication naturelle dans ce fait que ce n'est pas seulement le dépôt, mais — et probablement surtout — les composés dissous qui par un chauffage continué subissent une décomposition et une hydrolyse ultérieures.

Quant à la concentration en ions hydrogène, on voit que le chauffage prolongé ne la fait pas diminuer ultérieurement d'une façon notable. Il n'y a rien d'étonnant à cela, si nous songeons que la coagulation de la matière protéique aura pour effet de diminuer la concentration en ions hydrogène, tandis qu'une dissolution du coagulum avec décomposition hydrolytique, donc avec formation d'un nombre égal de groupes aminés et carboxylés, doit au contraire faire augmenter cette concentration ou, tout au moins, tendre à la maintenir constante.

Laissant de côté toute considération théorique sur la nature de la coagulation, nous nous bornerons, pour terminer, à relater un petit essai facile à faire, mais très instructif, et qui démontrera que certains phénomènes d'adsorption ont aussi une part dans ce processus.

Pour cet essai nous nous sommes servis d'un mélange de

600 cc. d'une solution à env. 4 % de blanc d'œuf,
120 » d'acide chlorhydrique norm. au $^1/_{10}$ et
120 » d'eau.

Ce mélange avait la concentration ionique optimale de la coagulation, p_H^+ étant trouvé égal à 4.69.

On a fait coaguler 400 cc. du mélange par chauffage dans l'eau bouillante pendant une demi-heure, et ensuite, après avoir refroidi pendant un quart d'heure dans de l'eau froide, on a séparé par filtration 200 cc. environ.

30 cc. de la liqueur filtrée contenaient $8^{mgr}.62$ d'azote.

Ensuite on a chauffé dans l'eau bouillante pendant 2 heures les trois solutions suivantes:

a) 50 cc. de la liqueur filtrée sans aucune addition,
b) 50 » de la liqueur filtrée additionnée d'un peu du dépôt coagulé, et
c) le reste de la portion principale renfermant de beaucoup la plus grande partie du coagulum.

Après le chauffage on a fait refroidir les trois portions, et puis, après filtration, on a fait le dosage de l'azote dans 30 cc. des liqueurs filtrées.

30 cc. du filtrat de l'essai a) contenaient $8^{mgr}.50$ d'azote
30 » » » » » b) » $7^{mgr}.98$ »
30 » » » » » c) » $5^{mgr}.50$ »

Un second essai fait avec 400 cc. du même mélange, en procédant de la même manière, avec cette seule différence que la filtration des 200 cc. avait lieu immédiatement après une demi-heure de chauffage, — a donné des résultats similaires:

30 cc	du premier filtratum (200 cc. env.)	contenaient	$9^{mgr}.60$ d'azote
30 »	» filtrat de l'essai a)	»	$9^{mgr}.44$ »
30 »	» » » » b)	»	$8^{mgr}.92$ »
30 »	» » » » c)	»	$5^{mgr}.82$ »

De ces deux essais nous tirons cette conclusion que, si l'on sépare par filtration l'abondant dépôt formé par la première chauffe d'une demi-heure, on peut chauffer ultérieurement la liqueur filtrée sans qu'il se produise un nouveau dépôt appréciable. Si, par contre, on ajoute au filtrat un peu du dépôt séparé et qu'alors on chauffe de nouveau, on verra diminuer la teneur en azote non-coagulé, et un chauffage en présence de quantités abondantes du dépôt aura pour conséquence de faire décroître très fortement la proportion d'azote de la solution.

Décembre 1910.

QUELQUES REMARQUES SUR LE TITRAGE IODOMÉTRIQUE D'ACIDES ET SUR LA MÉTHODE KJELDAHL POUR LE DOSAGE DE L'AZOTE.

PAR

R. KOEFOED.

DANS son intéressant travail «Die Alkalinität des Meerwassers»[1]) Ernst Ruppin, pour la détermination de l'alcalinité (c'est-à-dire le pouvoir de neutralisation vis-à-vis d'acides), recommande l'acidimétrie iodométrique remise en usage par Kjeldahl[2]) en 1883, et après avoir indiqué les avantages que présente cette méthode, il en décrit le principe et l'application.

Dans l'exposé de Ruppin il y a cependant divers points qui ne paraissent pas très clairs, et comme un autre savant[3]) a en même temps publié des recherches présentant le même défaut, on aura intérêt, je pense, à ce que certains côtés de cette question soient étudiés à nouveau.

Ruppin[4]) fait l'étalonnage de la solution d'hyposulfite contre une solution normale au $^1/_{20}$ d'iodate de potassium avec addition d'iodure de potassium et d'un excès d'acide chlorhydrique.

Par une solution normale au $^1/_{20}$ d'iodate de potassium il entend une solution qui — d'accord avec la marche de la réaction d'après l'équation:

$$5\,KJ + KJO_3 + 6\,HR \longrightarrow 3\,J_2 + 6\,KR + 3\,H_2O \ldots . (1),$$

ou R signifie un reste d'acide monovalent — contient dans 1 l. $^1/_{20} \times {}^1/_6$ molécule-gramme = $1^{gr}.7835$ d'iodate potassique desséché à la température ordinaire sur le pentoxyde de phosphore, ou bien à 250^0.

---

[1]) Zeitschrift für anorg. Chemie **66**, 122 (1910).

[2]) Comptes-rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg **2**, 1; Zeitschrift für anal. Chemie **22**, 366.

[3]) L. S. Fridericia, Undersøgelser over Fosterstofskifte. Çopenhague 1910.

[4]) A l'endroit cité, p. 127.

Après avoir effectué l'étalonnage de cette manière, Ruppin fait une vérification indirecte de la pureté de l'iodate: »A 50 cc. d'eau on ajoute 2 gr. d'iodure de potassium, 20 cc. de solution norm. au $^1/_{20}$ d'iodate de potassium et 15 cc. d'acide chlorhydrique norm. au $^1/_{20}$, dont la normalité a été établie à l'égard des carbonate et oxalate de sodium; cela fait, on titre de nouveau au moyen de la solution d'hyposulfite. Les deux valeurs trouvées doivent concorder.»

Cette dernière conclusion n'est pas exacte; il est vrai que la réaction, qui suit l'équation ci-dessus (1), s'achève pour ainsi dire instantanément quand il y a un excès d'acide (ce qui est le cas pour la méthode employée par Ruppin pour l'étalonnage de la solution d'hyposulfite); mais si la quantité d'acide est moindre que celle calculée d'après l'équation, ainsi qu'il en sera toujours le cas lors de l'application de cette réaction à l'acidimétrie iodométrique, sa vitesse ira toujours en diminuant[1]) et elle n'atteindra point l'étendue indiquée par l'équation, d'après laquelle la quantité d'iode mise en liberté est équivalente à celle de l'acide utilisé.

Voici la manière dont les déterminations d'alcalinité sont alors exécutées par Ruppin: Dans un matras Erlenmeyer en verre d'Iéna muni d'un bouchon rodé à l'émeri, on met 200 cc. d'eau de mer et 15 cc. d'acide chlorhydrique normal au $^1/_{20}$; après avoir fait bouillir ce mélange pendant quelques minutes jusqu'à élimination de l'acide carbonique, on fait refroidir jusqu'à la température du laboratoire. On ajoute alors 15 cc. d'une solution au vingtième d'iodate potassique et 10 cc. d'une solution à 10 pour cent d'iodure de potassium, et ensuite on laisse en repos le matras bouché à l'abri de la lumière $^5/_4$ d'heure, après quoi on fait le titrage avec de l'hyposulfite normal au $^1/_{50}$. La différence entre le nombre de centimètres cubes de solution d'hyposulfite exigé par 15 cc. d'acide chlorhydrique au $^1/_{20}$ et le nombre de centimètres cubes de solution qu'a demandé la détermination, différence multipliée par le titre de cette même solution, indique alors, en centimètres cubes d'acide chlorhydrique au $^1/_{10}$, l'alcalinité de l'eau de mer, laquelle par multiplication par le facteur correspondant peut être recalculée en centimètres cubes d'acide carbonique.

[1]) Comparez: Saul Dushman: Journ. of Physic. Chem. **8**, 453; résumé dans le Chem. Centralbl. 1904, II, 1489.

Ruppin trouve que deux déterminations d'alcalinité d'une même eau «concordent toujours», la différence étant tout au plus de 0cc.15 d'acide carbonique. Cependant il fait remarquer ce qui suit: «Malheureusement ma méthode est entachée d'un manque de sûreté que je n'ai pas pu trouver moyen d'éviter. En déterminant la quantité d'hyposulfite correspondant à 15 cc. d'acide chlorhydrique norm. au $^1/_{20}$, on obtient des valeurs différentes suivant qu'on opère en présence de 50 ou de 200 cc. d'eau distillée. Le plus grand écart est de 0cc.20 d'hyposulfite norm. au $^1/_{50}$, et la valeur la plus élevée est trouvée dans les cas des solutions concentrées; la différence semble être trop insignifiante pour faire renoncer à la méthode; peut-être aussi pourra-t-on trouver la raison de cet inconvénient et par cela même le moyen de l'éviter».

Déjà en 1888, Kjeldahl a signalé la cause de cette erreur comme aussi le moyen de l'éviter. Lorsque, en 1883, il rappela l'attention sur l'application du titrage iodométrique des acides au dosage de l'azote, il ne se rendait pas bien compte de toute la portée de cet état de choses, qui a plus tard été examiné plus a fond, entre autres, par Gunner Jørgensen en 1897[1]). Comme cependant. à cause de certaines irrégularités, la méthode avait été abandonnée de nouveau presque partout où elle avait été adoptée, Kjeldahl reprit la question en 1888 et, se basant sur une série de considérations théoriques sur la marche de cette réaction, élabora le procédé pratique de titrage iodométrique des acides qui est toujours employé dans notre laboratoire de Carlsberg pour les nombreux dosages d'azote qu'on y fait et dont les principes devraient, sans aucun doute, être appliqués partout où il y a lieu de doser des acides par la méthode iodométrique.

La titration est opérée toujours dans un même volume de liquide, au cas particulier 100 cc., en prenant soin, lors de la distillation de l'ammoniaque, de faire passer dans le récipient (fiole Erlenmeyer) renfermant l'acide titré (ordinairement 15 cc. d'acide sulfurique au $^1/_7$ env.) une quantité de liquide telle que

---

[1]) Bulletin de l'Académie Royale des Sciences et des Lettres du Danemark, 1897, p. 351: «Nogle jodometriske Undersøgelser»; dans ce mémoire l'auteur rend compte d'un certain nombre de mesures des vitesses de réaction de divers acides dans le processus qui nous occupe, et d'autre part de diverses réactions secondaires auxquelles il donne lieu; voir aussi Zeitschrift für angew. Chemie **19**, 18.

le volume total se monte à 100 cc.; dans les essais témoins on peut simplement compléter à ce volume avec de l'eau bouillie distillée. Ensuite on ajoute au liquide 10 cc. de solution à 5 pour cent d'iodure de potassium, 2 cc. de solution à 2 pour cent d'empois (saturée de chlorure sodique) et enfin 2 cc. de solution à 4 pour cent d'iodate de potassium, sur quoi on achève la titration, toujours dans un même espace de temps.

Pour la détermination du temps on peut se servir utilement d'un sablier dont le sable s'écoule en 2 minutes et qu'on met en train au moment où l'on ajoute au liquide la solution d'iodate potassique; au début de la titration, la solution d'hyposulfite peut couler assez vite, si l'on a soin de secouer la fiole afin d'en bien mélanger le contenu; mais lorsque la teinte de la solution est devenue d'un bleu foncé pur, l'addition doit se faire goutte à goutte, et il est alors facile d'avoir soin d'ajouter la dernière goutte ou demi-goutte juste au moment où le sable finit de s'écouler.

S'il n'est pas nécessaire de connaître avec exactitude le titre de l'acide utilisé, par contre, celui de la solution d'hyposulfite doit être déterminé avec la plus grande précision possible. L'étalonnage de cette solution peut être faite de diverses manières; mais ce qui doit surtout décider du choix du procédé, c'est la facilité et la sûreté avec lesquelles on peut se procurer à l'état de pureté et de composition constante la matière destinée à servir d'étalon.

Quelque excellent et quelque rigoureux que soit l'étalonnage par rapport à l'iode libre, il n'est point facile de se procurer ce dernier dans un état de pureté suffisante, de même que la vérification du degré de pureté et, d'autre part, la pesée présentent aussi certaines difficultés. L'étalonnage vis-à-vis d'une quantité d'iode libérée quantitativement d'une proportion pesée d'iodate ou de biiodate potassique en présence de l'iodure potassique et d'un excès d'acide offre certains avantages, il est vrai, mais les produits de ce genre qui sont dans le commerce sont loin d'être purs[1]), et l'épuration ainsi que la vérification du degré de pureté sont assez pénibles.

---

[1]) N. Bjerrum: Meddelelser fra Kommissionen for Havundersøgelser, Hydrografi I, Nr. 5 (192).

Comme une méthode rationnelle d'étalonnage Kjeldahl[1]) proposa de se servir du sulfate d'ammonium recommandé en 1882 par O. Knublauch[2]). Lorsque, comme nous le faisons au laboratoire de Carlsberg, on emploie la solution d'hyposulfite à une concentration telle $\left(\frac{\text{normal}}{14.01}\right)$ que 1 cc. répond à 1 mgr. d'azote, l'ammoniaque obtenu par distillation de 50 cc. d'une solution de sulfate d'ammonium contenant pour $\frac{1}{2}$ l. 1 gr. de ce sulfate, doit neutraliser une quantité d'acide équivalant à 21cc.20 de solution d'hyposulfite. Si la solution de sulfate d'ammonium contient par $\frac{1}{2}$ l. a gr. de ce sel, et que la consommation en moins après distillation de 50 cc. soit de b cc d'hyposulfite, le titre de celle-ci sera:

$$\frac{21{,}20 \times a}{b} \times \frac{\text{normal}}{14.01}.$$

Il peut y avoir quelque difficulté à déshydrater le sel; mais si, suivant les indications de Knublauch, on le dessèche à l'état de poudre fine à la température de 100° ou, encore mieux, dans le vide à 60° à 100°, il cède toute son eau; aussi, lors de l'emploi des appareils distillatoires indiqués par Kjeldahl[3]), cette méthode peut-elle fort bien être employée.

Il peut être très avantageux de partir de la substance type de S. P. L. Sørensen[4]): oxalate de sodium ($Na_2C_2O_4$ = 134.00), en en faisant décomposer sur une flamme d'alcool, puis dissoudre dans un volume d'acide déterminé, une portion pesée de ce sel séché dans le vide au-dessus de l'acide sulfurique. Le titre de la solution d'hyposulfite est alors représenté par la différence entre la quantité d'hyposulfite exigée par le volume d'acide mis en jeu avant et après la saturation partielle; a-t-on employé a gr. d'oxalate, et la différence susmentionnée est-elle de b cc., le titre de la solution d'hyposulfite est alors de

$$\frac{1000 \times 28.02 \times a}{134.00 \times b} \times \frac{\text{normal}}{14.01}.$$

Enfin on peut, d'après Lunge[5]), utiliser le carbonate de

---

[1]) A l'endroit cité, 193.

[2]) Zeitschrift für anal. Chemie **21**, 161.

[3]) Ces mêmes Comptes-rendus **2**, 197; voir aussi S. P. L. Sørensen et C. Pedersen *ibid.* **6**, 126 (1903), Zeitschrift für physiol. Ch. **39**, 513 (1903), et A. C. Andersen, Tidsskrift for Kemi, Farmaci og Terapi 1909, 225.

[4]) Bull. de l'Académie R. du Sc. et des L. du Danemark 1900, 189, Zeitschrift für anal. Ch. **42**, 512.

[5]) Zeitschrift für angew. Ch. **17**, 195.

sodium déshydraté par un procédé spécial indiqué par lui. A partir de a gr. de carbonate ($Na_2CO_3 = 106.00$), et posant la différence ci-dessus égale à b cc., on aura le titre suivant:

$$\frac{1000 \times 28.02 \times a}{106.00 \times b} \times \frac{\text{normal}}{14.01}.$$

D'une série d'essais qui ont été faits sur l'étalonnage d'une solution d'hyposulfite, nous en citerons un à titre d'exemple:

a) **Étalonnage vis-à-vis de l'iode libre.** De l'iode pur sublimé à nouveau (produit commercial), puis réduit en poudre fine, fut desséché dans l'exsiccateur sur du chlorure de calcium, puis sublimé encore à une douce chaleur en présence d'un tiers de son poids d'iodure potassique desséché et finement broyé.

Après avoir laissé en repos sur le chlorure de calcium, on fit dissoudre $0^{gr}.5099$ d'iode en présence de $3^{gr}.5$ d'iodure de potassium en complétant jusqu'à 250 cc. De cette solution

25	cc.	ont demandé	$5^{cc}.70$	d'hyposulfite
50	»	»	$11^{cc}.45$	»
50	»	»	$11^{cc}.45$	»
100	»	»	$22^{cc}.85$	»

c'est-à-dire: $0^{gr}.5099$ d'iode qui exigeraient $56^{cc}.286$ de solution $\frac{n}{14.01}$ d'hyposulfite, ont demandé $57^{cc}.15$ de la solution expérimentée, dont la normalité est donc de $0.9849 \times \frac{n}{14.01}$.

Après un repos prolongé pendant 24^h dans l'exsiccateur, $0^{gr}.1009$ d'iode dissous dans la fiole même en présence de 1 gr. d'iodure potassique jusqu'à concurrence de 90 cc., exigea $11^{cc}.30$ de solution d'hyposulfite, de sorte que le titre de celle-ci est de

$$\frac{11.138}{11.30} \times \frac{n}{14.01} = 0.9856 \times \frac{n}{14.01}.$$

b. **Étalonnage contre l'iodate de potassium.** $1^{gr}.7926$ d'iodate de potassium (Kahlbaum) desséché dans le vide sulfurique jusqu'à poids constant, furent dissous dans de l'eau bouillie jusqu'à 2 l. 100 cc. de la solution ainsi obtenue doivent répondre à $35^{cc}.20$ d'hyposulfite, $\frac{n}{14.01}$. On en préleva 25 et 50 cc., puis y ajouta, respectivement, 65 et 40 cc. d'eau distillée et bouillie, 10 cc. de solution à 5 pour cent d'iodure de potassium et 2 cc. d'acide chlorhydrique à 33 pour cent, et enfin, après avoir versé de l'hyposulfite jusqu'à coloration légèrement jaune, on ajouta 2 cc. de solution d'empois, pour achever alors la titration.

25	cc.	exigèrent	$8^{cc}.93$ et	$8^{cc}.92$ d'hyposulfite
50	»	»	$17^{cc}.85$ et	$17^{cc}.85$

c'est-à-dire, 100 cc. demandèrent $35^{cc}.70$ de la solution d'hyposulfite, dont le titre est, par conséquent:

$$\frac{35.20}{35.70} \times \frac{n}{14.01} = 0.9861 \times \frac{n}{14.01}.$$

c. Étalonnage contre le biiodate de potassium. $0^{gr}.8617$ de biiodate de potassium (Kahlbaum) séché dans le vide sulfurique, fut dissous dans de l'eau bouillie jusqu'à 1 l.; 100 cc. de cette solution repondent à $37^{cc}.15$ de solution $\frac{n}{14.01}$ d'hyposulfite. La titration fut effectuée par le procédé indiqué en b.

25 cc. exigèrent $9^{cc}.45$ et $9^{cc}.42$ d'hyposulfite
50 » » $18^{cc}.87$ et $18^{cc}.85$ »

c'est-à-dire: 100 cc. demandèrent $37^{cc}.73$ de la solution d'hyposulfite, dont le titre est, par conséquent:

$$\frac{37.15}{37.73} \times \frac{n}{14.01} = 0.9847 \times \frac{n}{14.01}.$$

d. Étalonnage contre le sulfate d'ammonium. Après purification par des recristallisations répétées du produit commercial pur, $2^{gr}.5227$ de ce sel desséchés dans le vide sulfurique, perdirent $0^{gr}.0002$. $1^{gr}.0250$ du sel séché dans le vide et renfermant $0^{gr}.21733$ d'azote, fut dissous dans l'eau bouillie jusqu'à $^1/_2$ l., et 50 cc. furent distillés en présence de 160 cc. d'eau bouillie et de 45 cc. de lessive de soude à env. 33 pour cent. Après avoir mis dans le récipient 15 cc. d'*acide sulfurique*[1]), on y fit passer par distillation une quantité telle que le volume fût de 100 cc.; la quantité d'hyposulfite équivalente à l'acide fut déterminée dans un essai témoin par distillation de 210 cc. d'eau bouillie en présence de 45 cc. de la même lessive de soude.

15 cc. d'*acide sulfurique* exigèrent $30^{cc}.25$ et $30^{cc}.28$ d'hyposulfite, en moyenne $30^{cc}.265$; après distillation de l'ammoniaque $8^{cc}.35$ et $8^{cc}.35$ d'hyposulfite, en moyenne $8^{cc}.350$. La différence est donc $21^{cc}.915$, de sorte que le titre de la solution d'hyposulfite est (v. p. 56):

$$0.9917 \times \frac{n}{14.01}.$$

Desséché jusqu'à poids constant dans le vide à 60^0, le reste du sel séché perdit pour $1^{gr}.4880$ $0^{gr}.00045$; on procéda de la même manière que ci-dessus en mettant en œuvre $1^{gr}.0264$.

15 cc. d'*acide sulfurique* exigèrent $30^{cc}.25$ et $30^{cc}.28$ d'hyposulfite, en moyenne $30^{cc}.265$; après distillation de l'ammoniaque, $8^{cc}.23$ et $8^{cc}.25$ d'hyposulfite, moyenne $8^{cc}.240$. La différence est ici de $22^{cc}025$, et le titre de la solution d'hyposulfite:

$$0.9881 \times \frac{n}{14.01}.$$

Par dessiccation dans le vide à 100^0, $2^{gr}.1285$ du sel perdirent $0^{gr}.0008$; $1^{gr}.0074$ du sel séché fut soumis au même traitement que plus haut.

---

[1]) Nous entendons par là de l'acide sulfurique normal à env. $^1/_7$. Etalonné contre une solution norm. au $^1/_5$ de soude, l'acide utilisé s'est trouvé être de $1.0038 \times \frac{n}{7}$. Pour tous nos mesurages de 15 cc. d'*acide sulfurique* nous nous sommes servi d'une même pipette, laquelle était entachée d'un défaut, qui avait pour effet que 15 cc. d'*acide sulfurique* veut dire, en réalité, $15^{cc}.067$ d'acide norm. au $^1/_7$. Dans tous les autres mesurages nous avons fait usage de fioles jaugées étalons et de pipettes étalons.

15 cc. d'*acide sulfurique* exigèrent 30cc.25 et 30cc.30 d'hyposulfite, moyenne 30cc.275; après distillation de l'ammoniaque 8cc.65 et 8cc.65, moyenne 8cc.650. Différence 21cc.625; titre de la solution d'hyposulfite:

$$0.9877 \times \frac{n}{14.01}.$$

e. Étalonnage contre l'oxalate de sodium. Desséché pendant 72 heures dans le vide sulfurique, le sel ne céda rien. 0gr.8058 fut décomposé suivant les indications de S. P. L. Sørensen, puis dissous dans 100 cc. d'*acide sulfurique*, et après avoir chassé par ébullition l'acide carbonique, on compléta la solution avec de l'eau bouillie jusqu'à 250 cc. De plus, on compléta 100 cc. d'*acide sulfurique* à 250 cc., après quoi des volumes mesurés des deux solutions, dilués à 100 cc., furent titrés au moyen de la solution d'hyposulfite par le procédé habituel.

25 cc. de solution d'acide demandèrent 20cc.18 et 20cc.18 d'hyposulfite, en moyenne 20cc.18.

25 cc. de la solution *oxalique* demandèrent 3cc.10 et 3cc.08 d'hyposulfite, moyenne 3cc.09; différence: 17cc.09.

50 cc. de solution d'acide demandèrent 40cc.35 d'hyposulfite;

50 cc. de solution *oxalique*, au contraire, seulement 6cc.18. Différence 34cc.17 de solution d'hyposulfite. Titre de cette solution:

$$0.9861 \times \frac{n}{14.01}.$$

f. Étalonnage contre le carbonate de sodium séché d'après Lunge. 0gr.7016 fut dissous dans 100 cc. d'*acide sulfurique* comme précédemment (voir e).

25 cc. de solution d'acide exigèrent 20cc.16 et 20cc.20 d'hyposulfite, en moyenne 20cc.18.

25 cc. de solution de *carbonate* exigèrent 1cc.35 et 1cc.38 d'hyposulfite, moyenne 1cc.365. Différence 18cc.815.

50 cc. de solution d'acide exigèrent 40cc.38 d'hyposulfite.

50 cc. de solution de *carbonate* exigèrent 2cc.75 et 2cc.75 d'hyposulfite, moyenne 2cc.75. Différence 37cc.63, de sorte que le titre de la solution d'hyposulfite est de

$$0.9857 \times \frac{n}{14.01}.$$

Quant à l'application de la titration iodométrique au dosage de l'azote d'après Kjeldahl, on a proposé d'étalonner la solution d'hyposulfite au moyen d'un composé organique à teneur connue en azote et facilement préparable, prétendant que, en faisant l'étalonnage dans des conditions identiques à celles dans lesquelles les dosages de l'azote sont effectués, on parviendrait a éliminer du résultat l'effet des causes d'erreurs inhérentes à la méthode. Bien qu'il soit évident que cette supposition n'est exacte que si, lors du dosage de l'azote d'après Kjeldahl, la matière à analyser se comporte tout à fait de la même façon que le composé utilisé pour l'étalonnage, nous avons néanmoins entre-

pris un certain nombre d'essais sur l'étalonnage de la même solution d'hyposulfite que celle ayant servi pour les déterminations indiquées plus haut.

Ces essais ont porté sur la glycine ($C_2H_5NO_2 = 75.05$, teneur en azote calculée: 18,67 pour cent) et sur l'acide hippurique ($C_9H_9NO_3 = 179.082$, azote calculé: 7.823 pour cent).

La glycine dans les premiers essais était une préparation ancienne (I) fournie par Kahlbaum et que nous avons fait recristalliser dans de l'eau, pour le sécher ensuite dans le vide sur l'acide sulfurique. Dans les autres essais nous nous sommes servi d'une préparation nouvelle (II) fournie par la même maison. En faisant recristalliser dans l'eau cette préparation II, nous avons remarqué que, rapprochée à une douce chaleur, l'eau-mère provenant des cristaux séparés en premier lieu, a fourni une seconde cristallation sentant très fortement l'ammoniaque. La glycine employée pour les essais nos 7 à 9 recristallisée une fois, celle servant pour les essais nos 10, 11, 18 et 19 le fut 2 fois, et celle des essais nos 14, 15, 20 et 21, 3 fois, tandis que celle utilisée pour les essais 12 et 13 fut obtenue en faisant précipiter à l'alcool l'eau-mère provenant de la seconde recristallisation, et que celle destinée aux essais nos 16 et 17 fut tirée de la même manière de l'eau-mère de la 3ième recristallisation. Après avoir été finement divisées, toutes les préparations furent desséchées dans le vide sulfurique jusqu'à poids constant.

L'acide hippurique fourni également par Kahlbaum, fut recristallisé 3 fois dans de l'eau, puis séché dans le vide sulfurique (essais nos 22 à 24); dans les essais nos 25 à 33 il subit une dessiccation ultérieure dans le vide à 72 à 74°.

Les essais furent effectués comme des dosages d'azote habituels soit d'après Kjeldahl[1]), soit d'après Kjeldahl-Gunning[2]) dans la modification employée dans notre laboratoire de Carlsberg[3]). Dans les dosages d'après Kjeldahl, la matière fut chauffée pendant 3 à 5 heures en présence de 10 cc. d'acide sulfurique et de 0gr.25 d'oxyde cuivrique; après oxydation de la liqueur au moyen du permanganate potassique finement pulverisé, on la dilua, puis la transvasa avec, en tout, env. 200 cc. d'eau,

[1]) Voir S. P. L. Sørensen et C. Pedersen: à l'endroit cité.

[2]) I. W. Gunning, Zeitschr. f. analyt. Ch. **28**, 188 (1889).

[3]) S. P. L. Sørensen et A. C. Andersen: Ces mêmes Comptes-rendus **6**, 193 (1905). A. C. Andersen: à l'endroit cité.

dans le ballon en cuivre indiqué par Kjeldahl. On y versa 50 cc. de lessive de soude à 33 pour cent env., puis distilla jusqu'à ce que le récipient contînt 100 cc.

Lors de l'emploi de la modification Gunning, on chauffa la matière une demi-heure en présence de 20 cc. d'acide sulfurique concentré et de 5 gr. de sulfate de potassium avec addition de 0gr.5 d'oxyde cuivrique; ensuite on ajouta encore 15 gr. de sulfate potassique pour parfaire la décomposition sans oxydation avec du permanganate de potassium, et enfin on effectua la distillation après dilution comme précédemment et au contact de 70 cc. de lessive de soude. Le récipient contenait toujours 15 cc. d'*acide sulfurique*, et la quantité y correspondante d'hyposulfite fut determinée dans chaque série d'essais par des essais témoins dans lesquels 0gr.3 de papier-filtre exempt d'azote fut traité comme ci-dessus d'après Kjeldahl et Kjeldahl-Gunning dans le même temps que les dosages correspondants.

Les données expérimentales résumées dans les tableaux I et II ont servi à calculer le titre de la solution d'hyposulfite, lequel nous posons égal à $T \times \frac{n}{14.01}$, où T indique la proportion entre l'azote pesé en milligrammes et la différence y correspondante de solution d'hyposulfite en centimètres cubes. T a été calculé par rapport à la glycine au moyen de l'équation $T = \frac{14.01}{75.05} \times \frac{a}{b}$, et par rapport à l'acide hippurique au moyen de $T = \frac{14.01}{179.082} \times \frac{a}{b}$, où *a* signifie la quantité pesée de glycine ou d'acide hippurique, et *b* la différence y correspondante de solution d'hyposulfite (voir tableaux I et II, p. 62).

Les déterminations précédemment indiquées du titre de la solution d'hyposulfite ont donc, par étalonnage au moyen des substances ci-après énumerées, donné les valeurs suivantes de T:

a. Iode libre	0.9853	Moyenne: 0.9859
b. Iodate de potassium	0.9861	
c. Biiodate de potassium	0.9847	
d. Sulfate d'ammonium	0.9877	
e. Oxalate de sodium	0.9861	
f. Carbonate de sodium	0.9857	
g. Glycine d'après Kjeldahl (1.00353 / 0.99893 / 0.99545)	0.9989	
» » Kjeldahl-Gunning	1.0040	
h. Acide hippurique d'après Kjeldahl	0.9963	
» » » Kjeldahl-Gunning	1.0029	

Tableau I. *Glycine.*

N° de l'essai	Glycine	Traité d'après	Durée de la chauffe en heures	Essais de contrôle		Glycine employée en gr.	Quantité d'hyposulfite en moins	T =	Moyenne
				Nombre	Consommation moyenne d'hyposulfite				
1	I.	Kjeldahl	3	3	30.22	0.1017	18.89	1.0050	
2	1 fois recristallisée	»	3	—	—	0.1281	23.92	0.9997	
3	»	»	3	—	—	0.1400	26.02	1.0044	1.0035
4	»	»	5	3	30.22	0.1017	18.92	1.0034	
5	»	»	5	—	—	0.1208	22.50	1.0023	
6	»	»	5	—	—	0.1357	25.17	1.0064	
7	II.	»	5	3	30.23	0.1417	26.40	1.0020	
8	1 fois recristallisée	»	5	—	—	0.1011	18.90	0.9986	0.9989
9	»	»	5	—	—	0.1142	21.40	0.9962	
10	2 fois recristallisée	»	5	3	30.22	0.1240	23.24	0.9960	
11	»	»	5	—	—	0.1072	20.09	0.9961	
12	Eau-mère précipitée	»	5	—	—	0.1445	27.07	0.9965	
13	par l'alcool	»	5	—	—	0.1093	20.47	0.9968	
14	3 fois recristallisée	»	5	—	—	0.1062	19.92	0.9952	0.9955
15	»	»	5	—	—	0.1264	23.72	0.9948	
16	Eau-mère précipitée	»	5	—	—	0.1157	21.72	0.9944	
17	par l'alcool	»	5	—	—	0.1159	21.77	0.9938	
18	2 fois recristallisée		6½	2	30.225	0.1385	25.625	1.0089	
19	»	Kjeldahl-	6½	—	—	0.1000	18.525	1.0077	
20	3 fois recristallisée	Gunning	6½	—	—	0.1500	28.025	0.9992	1.0041
21	»		6½	—	—	0.1033	19.275	1.0004	

Tableau II. *Acide hippurique.*

N° de l'essai	Traité d'après	Durée de la chauffe en heures	Essais de contrôle		Acide hippurique employé en gr.	Quantité d'hyposulfite en moins	T =	Moyenne
			Nombre	Consommation moyenne d'hyposulfite				
22	Kjeldahl	5	2	30.225	0.2547	20.025	0.9951	
23	do.	5	»	»	0.3023	23.725	0.9969	
24	do.	5	»	»	0.2300	18.075	0.9955	0.9963
25	do.	5½	2	30.225	0.3381	26.525	0.9972	
26	do.	5½	»	»	0.2209	17.325	0.9975	
27	do.	5½	»	»	0.2695	21.165	0.9962	
28	Kjeld.-Gunn.	5¼	2	30.225	0.3375	26.325	1.0030	
29	do.	5¼	»	»	0.2984	23.225	1.0052	
30	do.	5¼	»	»	0.2107	16.445	1.0023	1.0029
31	do.	6½	2	30.22	0.3276	25.60	1.0011	
32	do.	6½	»	»	0.2888	22.52	1.0033	
33	do.	6½	»	»	0.1932	15.08	1.0023	

Il ressort de ce tableau, d'un côté, que l'étalonnage au moyen de la glycine et de l'acide hippurique donne en moyenne une valeur de T notablement plus élevée (de 1,5 pour cent) que celle obtenue dans les étalonnages par les substances énumérées en a—f, y compris les substances types indiquees en e et f, — et, d'autre part, que la variation des valeurs de T obtenues au moyen des différentes préparations de glycine n'est pas négligeable (0,82 pour cent); enfin il appert aussi que, lorsqu'on fait usage de la modification apportée par Gunning à la méthode de Kjeldahl, la valeur de T se trouve plus élevée (de 0.57 pour cent) que si l'on suit le procédé primitivement indiqué par Kjeldahl.

La variation de T lors de l'étalonnage à l'aide de préparations de glycine de provenances diverses, montre combien il est difficile de préparer ce composé à l'état de pureté et de composition constante, et fait sentir l'absence de moyens permettant de vérifier le degré de pureté. Nos essais démontrent que, même lors de l'application de la titration iodométrique au dosage de l'azote d'après Kjeldahl, l'étalonnage de la solution d'hyposulfite au moyen d'une substance type est de beaucoup préférable à l'étalonnage par un ou l'autre des composés ci-dessus indiqués; en même temps on voit cependant que l'étalonnage à l'aide du sulfate d'ammonium est bien utilisable.

D'autre part, les essais portant sur la glycine et l'acide hippurique tendent à démontrer que la méthode Kjeldahl, soit dans sa forme primitive, soit — et surtout — dans la modification Gunning, est entachée d'une erreur, qui a pour conséquence que — fait d'ailleurs très connu — on arrive à un chiffre trop bas. Si l'on compare, pour les composés considérés, les résultats obtenus par la méthode primitive de Kjeldahl d'un côté, et, de l'autre, ceux que donne la modification Gunning, il est naturel d'admettre que la décomposition amène une perte d'azote due soit à une évaporation, soit à la décomposition du sulfate d'ammonium, et les essais que nous allons relater (tableaux III et IV, voir pp. 64 et 65) semblent confirmer tout à fait l'exactitude de cette manière de voir.

On fait dissoudre dans de l'eau distillée bouillie, jusqu'à concurrence de 1 l., une quantité pesée de sulfate d'ammonium desséché à 100° dans le vide. La solution ainsi obtenue est répartie, par portions de 50 cc. chacune, dans un certain nombre de ballons Kjeldahl de 100 et de 200 cc. de capacité; ensuite,

Tableau III.

$2^{gr}.2135$ de sulfate d'ammonium dissous jusqu'à 1 l.;
50 cc. de solution dans chaque essai.

15 cc. d'*acide sulfurique* exigèrent
dans 6 essais d'après Kjeldahl $30^{cc}.415$ d'hyposulfite.
4 » Kjeldahl-Gunning $30^{cc}.40$ »

N° de l'essais	Traité d'après	Durée de la chauffe en heures	Quantité d'hyposulfite en moins	T =
34	Kjeldahl	0	23.755	0.9877
35	»	0	23.735	0.9885
36	»	0	23.755	0.9877
37	»	0	23.735	0.9885
38	Kjeldahl-Gunning	0	23.70	0.9900
39	»	0	23.75	0.9880
40	»	0	23.75	0.9880
41	»	3	23.40	1.0027
42	»	3	23.60	0.9942
43	»	3	23.55	0.9963
44	»	6	23.60	0.9942
45	»	6	23.35	1.0049
46	»	6	23.45	1.0006
47	»	24	22.70	1.0336
48	»	24	22.20	1.0569
49	»	24	22.25	1.0545
50	Kjeldahl	24	23.615	0.9936
51	»	24	23.615	0.9936

après avoir additionné chaque ballon d'une goutte d'acide sulfurique concentré, on fait évaporer à siccité dans un séchoir à une température de 40 à 50^0. Les ballons destinés à être traités d'après Kjeldahl sont additionnés chacun de 10 cc. d'acide sulfurique concentré et de $0^{gr}.25$ d'oxyde cuivrique, tandis qu'à ceux qui doivent être traités d'après Kjeldahl-Gunning on ajoute 20 cc. d'acide sulfurique, 20 gr. de sulfate de potassium et $0^{gr}.5$ d'oxyde cuivrique; ensuite on chauffe comme à l'ordinaire. J'ai fait durer le chauffage pendant des temps variant de 0 à 24 heures, et alors j'ai fait la distillation en présence, respectivement, de 45 et de 70 cc. de soude, après avoir mis dans le récipient 15 cc. d'*acide sulfurique*. — Je me suis servi d'une solution d'hyposulfite

Tableau IV.

$2^{gr}.1196$ de sulfate d'ammonium dissous jusqu'à 1 l.;
50 cc. de solution dans chaque essai.

15 cc. d'*acide sulfurique* exigèrent
dans 3 essais d'après Kjeldahl $30^{cc}.42$ d'hyposulfite.
» 3 » » Kjeldahl-Gunning $30^{cc}.40$ »

N° de l'essai	Traité d'après	Durée de la chauffe en heures	Quantité d'hyposulfite en moins	T =
52	Kjeldahl	0	22.72	0.9890
53	»	0	22.73	0.9886
54	»	3	22.72	0.9890
55	»	3	22.72	0.9890
56	»	3	22.67	0.9912
57	»	6	22.72	0.9890
58	»	6	22.67	0.9912
59	»	6	22.64	0.9925
60	» [1]	6	22.72	0.9890
61	» [1]	6	22.74	0.9882
62	» [1]	6	22.67	0.9912
63	»	24	22.62	0.9934
64	»	24	22.67	0.9912
65	» [2]	24	22.62	0.9934
66	» [2]	24	22.60	0.9943
67	Kjeldahl-Gunning	24	21.57	1.0418
68	»	24	22.20	1.0122
69	» [2]	24	22.30	1.0077
70	» [2]	24	22.10	1.0168

[1]) Dans ces essais on a ajouté à chaque ballon $0^{gr}.3$ de papier-filtre et, le chauffage terminé, on a oxydé au moyen de permanganate potassique.
[2]) dans des ballons de 200 cc.

nouvellement préparée; pour l'étalonnage au moyen de l'*oxalate de sodium* j'ai pesé $0^{gr}.7127$ de ce sel pour le traiter de la maniere indiquée à la page 59; 50 cc. de la solution d'*oxalate* ainsi obtenue accusèrent une différence de $30^{cc}.20$ de solution d'hyposulfite, dont le titre est, par conséquent: $0.9869_6 \times \frac{n}{14.01}$.

De ces essais il ressort que la valeur de T croît — c'est-à-dire que la proportion d'azote retrouvée diminue — avec la durée de chauffage. En comparant entre eux les essais faits d'après

Kjeldahl et, de l'autre côté, ceux d'après Kjeldahl-Gunning (dans ces derniers la température de décomposition est plus élevée en raison de la forte teneur en bisulfate de potassium), on voit en outre, que T augmente aussi avec la température de décomposition. D'autre part, contrairement aux dires de plusieurs chimistes, le résultat n'est pas influencé par l'oxydation habituelle effectuée au moyen du permanganate de potassium.

Nous retrouvons le même état de choses dans nos essais sur l'acide hippurique desséché dans le vide à une température de 62 à 65°, essais dont nous avons rassemblé les résultats dans les tableaux V et VI, et pour lesquels nous avons fait usage de la même solution d'hyposulfite que dans les essais nos 34 à 70, en employant un *acide sulfurique* nouvellement préparé. La durée de chauffage dans ces deux séries expérimentales était de 6 heures et de 24 heures respectivement. Quant à la température de décomposition, nous en avons donné à propos de chaque essai une indication basée sur les apparences du liquide (ébullition) pendant le chauffage; là où ces indications manquent, nous avons considéré comme normale l'allure de la réaction. Dans le tableau V on trouvera de plus une indication des dimensions du col du ballon.

Tableau V.

Essais portant sur l'acide hippurique. Durée de chauffe: 6 heures.

15 cc. d'*acide sulfurique* exigèrent { d'après Kjeldahl { sans oxydation 29cc.90 d'hyposulfite. / avec » 29cc.90 » } / » Kjeldahl-Gunning 29cc.82 »

No de l'essai	Traité d'après	Acide hippurique employé en gr.	Quantité d'hyposulfite en moins	T =	Chauffage	Col du ballon
71	Kjeldahl [1]	0.2231	17.50	0.9974	—	étroit
72	» [1]	0.2557	20.10	0.9952	faible	large
73	» [1]	0.2045	16.05	0.9968	—	large
74	»	0.2321	18.20	0.9977	faible	étroit
75	»	0.2225	17.45	0.9975	—	large
76	»	0.1801	14.10	0.9965	—	large
77	Kjeldahl-Gunning	0.2936	23.17	0.9913	faible	large
78	»	0.2004	15.57	1.0069	fort	étroit
79	»	0.2031	15.92	0.9981	—	étroit
80	» [2]	0.2133	16.72	0.9980	—	—
81	[2]	0.1993	15.62	0.9982	—	—
82	» [2]	0.2395	18.32	1.0228	fort	—

[1] sans oxydation au moyen de permanganate potassium.
[2] Ballon de 200 cc.

Tableau VI.

Essais portant sur l'acide hippurique. Durée de chauffe: 24 heures.

15 cc. d'*acide sulfurique* exigèrent { d'après Kjeldahl { sans oxydation 29cc.90 d'hyposulfite. avec » 29cc.90 » ; » Kjeldahl-Gunning 29cc.85 »

No de l'essai	Traité d'après	Acide hippurique employé, en gr.	Quantité en moins d'hyposulfite	T =	Chauffage
83	Kjeldahl [1]	0.2015	15.80	0.9977	—
84	» [1]	0.1620	12.55	1.0099	fort
85	» [1]	0.1996	15.67	0.9965	—
86	»	0.2156	16.97	0.9939	faible
87	»	0.1857	14.53	0.9998	—
88	»	0.1360	10.60	1.0037	fort
89	Kjeldahl-Gunning	0.2039	15.35	1.0392	—
90	»	0.1369	10.10	1.0604	fort
91	»	0.1787	13.60	1.0279	—
92	» [2]	0.2365	18.50	1.0001	faible
93	» [2]	0.1405	10.80	1.0178	—
94	» [2]	0.1503	11.65	1.0274	—

[1] sans oxydation au moyen de permanganate potassique.
[2] Ballon de 200 cc.

Dans une série d'essais qui n'a pas été terminée parce que la solution d'hyposulfite en question c'était trouvée épuisée après la titration de 2 des 14 essais, nous avons constaté après 3 heures de chauffe les résultats que voici:

No de l'essai	Traité d'après	Acide hippurique employé en gr.	Quantité d'hyposulfite en moins en cc.	T =
95	Kjeldahl	0.1873	14.75	0.9934
96	»	0.2189	17.23	0.9939

Si dans les essais nos 41 à 96 on calcule les dosages d'azote pour $T = 0{,}9869_5$ (voir p. 65), on aura les résultats figurant à la page suivante.

A la vérité, les essais exposés plus haut ne peuvent pas établir si la perte d'azote est due à une évaporation ou à une décomposition du sulfate d'ammonium (le peu d'influence exercée par la dimension et la forme du ballon semble parler en faveur

N° de l'essai	Traité d'après	Durée de chauffe en heures	Mgr. d'azote mis en œuvre calculé	Azote retrouvé en mgr.	Azote retrouvé %	Teneur en azote %
	Sulfate d'ammonium					21.20
54—56	Kjeldahl	3	67.413	67.221	99.72	21.14
57—62	"	6	134.826	134.385	99.67	21.13
63—66 / 50—51	"	24	136.816	135.945	99.36	21.07
41—43	Kjeldahl-Gunning	3	70.398	69.669	98.97	20.98
44—46	"	6	70.398	69.482	98.70	20.92
47—49 / 67—70	"	24	160.282	153.393	95.36	20.29
	Acide hippurique					7.82
95—96	Kjeldahl	3	31.778	31.56	99.32	7.77
71—76	"	6	103.112	102.05	99.0	7.74
83—88	"	24	86.088	83.99	97.6	7.63
77—82	Kjeldahl-Gunning	6	105.552	103.95	98.5	7.72
89—94	"	24	82.106	78.96	96.2	7.55

de cette dernière alternative, mais ils montrent cependant que, partout où les circonstances le permettent — ce qui sera le cas pour ainsi dire presque toujours —, les dosages d'azote doivent être opérés en suivant la méthode primitivement indiquée par Kjeldahl et qui comporte une décomposition à l'acide sulfurique (avec addition d'acide phosphorique, s'il y a lieu) et à l'oxyde cuivrique, suivie d'une oxydation au moyen du permanganate de potassium. Les essais nous apprennent aussi qu'il ne faut pas faire durer le chauffage plus qu'il est nécessaire, c'est-à-dire 3 à 5 heures. Enfin, dans les cas où, le mode de traitement préconisé par Kjeldahl se trouvant être insuffisant[1]) (par ex. à propos des composés où les atomes d'azote occupent dans la molécule une position pouvant donner lieu à la formation d'un anneau pipéridique), la décomposition peut être effectuée d'après la modification Gunning, on voit qu'il convient également de réduire à son minimum la durée de la chauffe.

[1]) S. P. L. Sørensen et A. C. Andersen: Ces mêmes Comptes-rendus **6**, 193 (1905), Zeitschr. f. physiolog. Ch. **44**, 429 (1905).

DÉTERMINATION ÉLECTROMETRIQUE DE LA RÉACTION DES LIQUIDES RENFERMANT DE L'ACIDE CARBONIQUE.

PAR

K. A. HASSELBALCH.

(Laboratoires de l'Institut Finsen et de Carlsberg, à Copenhague).

Lors de recherches relatives à la chimie biologique, la nécessité s'impose très souvent de rechercher la réaction vraie, c'est-à-dire la concentration ionique des milieux dans lesquels ont lieu les réactions examinées.

Dans cet ordre d'idées, S. P. L. Sørensen[1]) a démontré dernièrement que dans les études sur la cinétique des réactions enzymatiques, la concentration en ions hydrogène joue un rôle analogue à celui de la température à laquelle on opère et, d'autre part, il a établi la concentration optimale des ions hydrogène pour un certain nombre de scissions enzymatiques.

La réaction vraie du sang et des autres humeurs du corps animal a également, depuis plusieurs années, fait l'objet d'investigations suivies. Au début, mon intention avait été d'étudier précisément les modifications qu'éprouve la réaction du sang dans des conditions expérimentales variées. On sait que tous les savants qui ces derniers temps se sont occupés de ce sujet[2]), sont unanimes sur le fait que la réaction du sang, dans des conditions normales, est située extrêmement près du point neutre, ce qui contredit carrément les théories admises autrefois, selon lesquelles le sang avait une réaction franchement alcaline.

Pour la détermination de la concentration en ions hydrogène

[1]) Etudes enzymatiques II. Comptes-rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg **8**, 1 (1909), et Bioch. Zeitschr. **21** (1909).

[2]) R. Höber: Pflügers Archiv **99**, 572 (1903). — G. Farkas, *ibidem* **98**, 551 (1903). — P. Fraenckel, *ibid.* **96**, 601 (1903).

des liquides, il existe, on le sait, plusieurs méthodes, dont les plus importantes sont la méthode électrométrique et la méthode colorimetrique. Tout en étant à peu près également bonnes quant a leur degré de précision, l'une et l'autre présentent des particularites qui, dans certains cas, sont susceptibles d'en restreindre l'application. C'est ainsi que la couleur propre du liquide expérimenté peut évidemment parfois rendre impossible tout mesurage colorimetrique de la réaction; c'est ce qui est le cas par exemple pour le sang. Un autre fait qui tend à entraver, à un degré à peu près égal, l'emploi de ces deux méthodes, est la teneur en acide carbonique et en bicarbonates du liquide considéré. Dans la nature bien des milieux de réactions enzymatiques contiennent de l'acide carbonique provenant parfois des scissions enzymatiques mêmes. Le sang montre, comme l'on sait, toujours une certaine tension d'acide carbonique, qui n'est pas la même dans le sang artériel et dans le sang veineux. Or, si au cours du mesurage — colorimétrique ou électrométrique — le liquide dégage de l'acide carbonique, la réaction mesurée se trouvera manifestement trop alcaline. Théoriquement parlant, il est, par conséquent, indispensable d'effectuer la détermination dans une atmosphère faisant équilibre d'acide carbonique au liquide expérimenté.

Si l'on mesure par voie colorimétrique un mélange, saturé d'acide carbonique, de solutions $\frac{\text{mol.}}{10}$ de bicarbonate sodique, $\frac{\text{mol.}}{15}$ de phosphate secondaire sodique et $\frac{\text{mol.}}{15}$ de phosphate primaire potassique (rapport des volumes mélangés 10 : 6 : 4), et si dans un essai on fait couler lentement 5 cc. du mélange dans l'éprouvette en appuyant la pointe de la pipette contre le fond de l'éprouvette, tandis que dans un autre essai on fait tomber goutte à goutte les 5 cc., on arrivera dans le premier cas à la concentration en ions hydrogène $10^{\div 6.61}$, dans le second cas $10^{\div 6.77}$, c'est-à-dire que dans ce dernier cas le liquide est devenu nettement plus alcalin que dans le premier cas, par suite d'un plus fort dégagement d'acide carbonique.

On a remarqué depuis longtemps déjà cette source d'erreur, qui se fait naturellement sentir le plus fortement dans le voisinage du point neutre. C'est pourquoi lors des mesurages de la réaction du sang, mesurages pour lesquels on est obligé de s'en tenir exclusivement à la methode électrométrique, il a fallu modifier de diverses manières le mode opératoire de façon à obvier, dans la mesure du possible, au dégagement d'acide carbonique. Ce n'est pas ici le lieu d'entrer dans les détails de ces modifi-

cations, d'autant que Michaelis et Rona[1]) les ont récemment décrites et en ont fait la critique. Il y a, en effet, une propriété qu'elles ont en commun les unes avec les autres et qui rend cette méthode à peu près inapplicable à l'étude des changements expérimentalement provoqués du sang: c'est que l'établissement de l'équilibre demande trop de temps, variant de 6 à 20 heures.

Or, Michaelis et Rona[2]) ont, il est vrai, proposé une modification permettant, suivant eux, d'établir l'équilibre en quelques minutes et, par suite, d'employer la méthode ainsi modifiée dans le but poursuivi. Ce qu'il y a de nouveau dans la modification de Michaelis et Rona, ce n'est pas l'atmosphère d'hydrogène qui se trouve en repos au-dessus du sang, ce qui empêche le sang d'éprouver une perte appréciable d'acide carbonique: ce qui la distingue, c'est ce simple artifice que la profondeur jusqu'à laquelle l'électrode hydrogène est enfoncée dans le sang est réduite au minimum, le contact entre électrode et sang n'étant établi qu'à l'aide de bulles d'écume formées par l'hydrogène bouillonnant à travers le sang.

Cependant Michaelis et Rona n'ont pas réussi à montrer la différence entre le sang veineux et le sang artériel, différence que, selon les expériences de Höber[3]), on doit admettre comme étant en tout cas des plus vraisemblables. Pour ce motif déjà, il fallait abandonner *à priori* leur méthode.

Pour ce qui concerne le dispositif que Michaelis et Rona ont imaginé dans le but de réduire au minimum le contact entre électrode et sang, on trouvera plus loin l'exposé de quelques observations qui feront voir quelle est la valeur de cet artifice. L'atmosphère d'hydrogène en repos, que cette méthode a de commun avec certaines modifications anciennes et qui est destinée à limiter la perte d'acide carbonique à un minimum insignifiant, ne me semble pas donner toute la satisfaction voulue. Il est évident, en effet, que dans ces conditions, de l'acide carbonique, si peu que se soit, pénètrera forcément par diffusion dans l'hydrogène. Or, cette diffusion même donne inévitablement lieu à deux sources d'erreurs[4]): En premier lieu, la pression partielle de l'hydrogène se trouve diminuée; toutefois, l'er-

[1]) Bioch. Zeitschr. **18**, 317 (1909).
[2]) A l'endroit cité.
[3]) A l'endroit cité.
[4]) Voir Michaelis et Rona: à l'endroit cité.

reur produite par ce fait dans le résultat du mesurage, sera dans le cas du sang (voir plus loin) fort minime et ne s'élèvera que par exception à 1 millivolt. En second lieu, la perte d'acide carbonique aura pour effet que l'alcalinité du liquide sera plus forte, et ce à un degré qui est pour le moment tout à fait inconnu. On verra dans la suite que cette dernière cause d'erreur n'est pas sans une certaine importance.

Je me suis donc efforcé de trouver pour la détermination électrométrique de la réaction de liquides renfermant de l'acide carbonique, une manière de procéder unissant une précision suffisante à une grande vitesse dans l'exécution.

Comme on l'aura vu par les remarques précédentes, aucune des méthodes connues à ce jour ne peut satisfaire à ces exigences. Et il va de soi que la solution de ce problème est des plus importantes. La nécessité de l'emploi d'une pareille méthode s'impose non seulement dans les cas où la détermination électrométrique seule est applicable — dans le cas du sang par exemple —, mais aussi comme méthode de contrôle pour la détermination colorimétrique de la réaction des liquides renfermant de l'acide carbonique.

Lors de mes travaux ayant pour but la solution du problème qui nous occupe, j'ai eu l'avantage inappréciable de pouvoir tirer parti de la grande expérience que possède M. le professeur S. P. L. Sørensen dans ce domaine. Dans le laboratoire de Carlsberg, où ces recherches ont été exécutées, non seulement j'ai trouvé un accueil bienveillant en général, mais encore un dispositif expérimental complet, tant pour l'électrométrie que pour la colorimétrie. Enfin je crois surtout devoir faire ressortir qu'il m'a été donné de faire usage des *solutions étalons* de Sørensen, solutions qui permettent de préparer d'une façon très commode des liquides possédant des concentrations en ions hydrogène exactement connues, de sorte que, en élaborant ma méthode, j'ai pu m'appuyer sur des mesurages très exacts effectués d'après les méthodes antérieures sur les mêmes liqueurs expérimentales.

J'ai l'honneur de présenter à M. le professeur Sørensen mes remerciements les plus sincères pour le concours si précieux qu'il m'a ainsi prodigué.

De même, j'adresse à M. Jürgensen, aide chimiste du laboratoire de Carlsberg, mes meilleurs remerciements du secours

qu'il m'a donné pour me mettre au courant de la méthode de mesurage. J'ai à remercier également M. Palitzsch, adjoint au même institut, pour avoir bien voulu se charger de l'exécution des déterminations colorimétriques qui devaient être effectuées en même temps que les déterminations électrométriques.

Pour mes recherches, après avoir cherché en vain une électrode d'oxygène utilisable, je me suis servi du dispositif expérimental électrométrique tel qu'il se trouve au laboratoire de Carlsberg[1]): Un élément composé d'une électrode au calomel plongée dans une solution norm. au $^1/_{10}$ de chlorure de potassium et d'une électrode à hydrogène (en platine platinée) immergée dans la solution dont on a à déterminer la concentration en ions hydrogène; on a intercalé entre les deux solutions électrolytes une solution 3,5 normale de chlorure de potassium[2]). Le potentiel de diffusion peut être negligé, en tout cas dans le voisinage du point neutre où ces mesurages ont été entrepris.

Comme dès le début j'avais eu l'intention de déterminer à l'aide de l'électrode introduite dans le courant de sang, la réaction de celui-ci continuant son cours même durant le mesurage, je dus me faire un vase électrolytique particulier permettant l'emploi du procédé que je viens d'indiquer. On trouvera plus loin la description de ce vase, qui s'est trouvé bien applicable dans la méthode à laquelle je m'arrêtai en définitive (Fig. 2).

Tout d'abord je recherchai s'il était possible d'obtenir des résultats exacts ou tout au moins constants, si l'électrode enduite de noir de platine et entourée d'une atmosphère d'hydrogène *courant*, était mise en contact avec la liqueur électrolytique *coulante* et saturée d'air (mélanges de phosphates d'après Sørensen). Je ne tardai pas à reconnaître qu'avec ce dispositif on arrivait en tout cas à un potentiel trop bas — une trop grande concentration en ions hydrogène —, et qu'on obtenait des résultats constants dans la mesure où les conditions expérimentales (vitesse du courant d'hydrogène et de la liqueur électrolytique, enfoncement de l'électrode) étaient maintenues constantes.

[1]) Voir S. P. L. Sørensen, Ces mêmes Comptes-rendus **8** (1909).
[2]) Voir N. Bjerrum: Zeitschrift für physik. Chemie **53**, 428 (1905).

Or, dans l'organisme vivant il sera naturellement impossible de maintenir constantes ces conditions; ainsi, par exemple, l'enfoncement de l'électrode variera dans les limites de la durée de chaque pulsation, de sorte que pour ce motif déjà il a fallu renoncer à cette modification. Cependant j'observai, d'accord avec Michaelis et Rona, que le potentiel mesuré était toujours d'autant plus élevé — et d'autant plus exact — que l'électrode était moins enfoncée dans le liquide expérimenté, de telle sorte que le résultat n'était, par exemple, que de 10 à 15 millivolts trop bas lorsque l'électrode touchait tout juste la surface du liquide.

Des essais dans lesquels j'ai tâché de saturer la liqueur électrolytique de mélanges d'hydrogène et d'oxygène au lieu d'air atmosphérique, montrèrent — ce qu'on aurait peut-être pu prévoir — que, aussitôt que la pression partielle de l'hydrogène dans la liqueur électrolytique se montre tant soit peu moindre que dans l'atmosphère entourant l'électrode, j'obtenais un potentiel trop bas, d'autant plus bas que l'électrode entrait plus profondément dans la liqueur électrolytique.

Ces observations me semblent indiquer que les conditions dans lesquelles on s'est jusqu'ici placé pour appliquer l'électrométrie à la détermination de la réaction du sang: hydrogène en repos surmontant le liquide expérimenté également en repos, ne peuvent pas donner des mesures constantes avant que l'échange de diffusion entre l'hydrogène et le liquide ne soit terminé; ceci semblerait expliquer pourquoi avec cette méthode il s'écoule 6 à 20 heures avant que le potentiel ne devienne constant. En outre, on pouvait à peine admettre que la «Methode des geringen Eintauchens» de Michaelis et Rona fût susceptible d'amener la constance plus rapidement que les méthodes anciennes, attendu que pour l'établissement de l'équilibre de diffusion il est évidemment indifférent que l'électrode entre plus ou moins profondément dans le liquide. D'un autre côté, quant à obtenir un résultat approximativement exact, il est incontestable qu'on y arrive un peu plus rapidement par la méthode de Michaelis et Rona.

Aussi, des essais que je fis en ce sens sur des mélanges de phosphates saturés d'air et avec de l'hydrogène en repos, me conduisirent-ils à reconnaître que, selon le degré d'enfoncement

de l'électrode, on arrive plus ou moins vite à une constance apparente de potentiel; mais cette constance n'est qu'apparente: car si alors on attend pour le moins 6 heures avant de mesurer à nouveau, ou si l'on sature le liquide et l'électrode d'hydrogène qu'on y fait passer, on obtient, avec le degré de précision habituel de $\pm$ 0.5 millivolt, le potentiel exact.

La figure ci-contre (Fig. 1) donne une représentation gra-

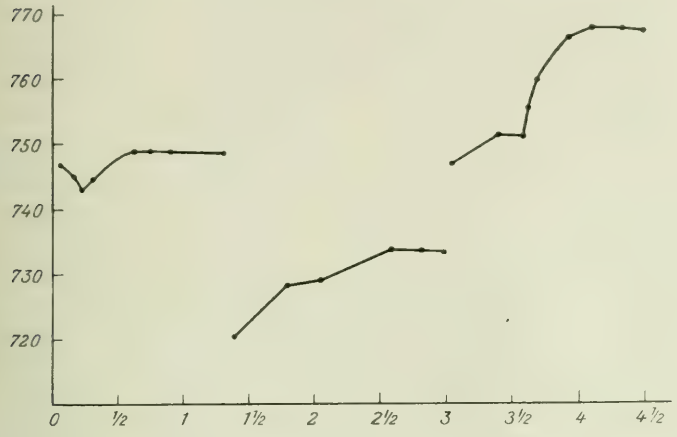


Fig. 1.

phique du résultat fourni par un tel essai fait avec de l'hydrogène en repos sur un mélange de phosphates saturé d'air atmosphérique dépourvu d'acide carbonique. Le nombre des heures a été porté en abscisses, les millivolts en ordonnées. Dans la première partie de ces essais l'électrode a tout juste touché la surface du liquide expérimenté, et en un peu plus d'une demi-heure on est arrivé à un potentiel «constant»; ensuite l'électrode a été enfoncée davantage (de 10 mm. environ) dans le liquide, et en un peu plus d'une heure on obtient alors une autre constance, plus basse, du potentiel. En répétant la première partie de notre essai on arrive à peu près au même résultat qu'auparavant, et finalement un courant d'hydrogène continué pendant 15 minutes fournit la constance réelle et vraie du potentiel.

En me fondant sur ces résultats, je crois pouvoir affirmer que la méthode de Michaelis et Rona doit être entachée d'erreurs analogues, bien que moins grandes que celles que nous avons constatées dans l'essai que nous venons de relater, et la

raison en est que le contact de l'électrode avec le liquide expérimenté n'est réalisé par ces deux chimistes qu'au moyen de bulles d'écume. D'ailleurs, je n'ai pas besoin de citer des résultats de mes propres essais comme preuve de ce que j'avance, Michaelis et Rona donnant eux-mêmes l'exemple suivant[1]) de leur mesurage de l'alcalinité d'un sérum:

«Zusammenstellung der Kette beendet um 11^{05} Vorm.:

Zeit	E. M. K. i Volt	
11^{07}	0.3447	
11^{17}	0.3405	
11^{30}	0.3372	
11^{55}	0.3383	
12^{10}	0.3376	
1^{30}	0.3338	als konstant betrachteter, endgültiger Wert.
1^{45}	0.3338	
2^{00}	0.3335	

Nächster Tag Vorm. 10^{00} 0.3401[2]).

Ainsi donc, après 2 heures et demie, on a atteint une «constance» qui est d'environ 6.5 millivolts plus basse que celle constatée environ 20 heures plus tard. Pour qui examine les choses sans parti pris, il semble, par conséquent, assez arbitraire de qualifier précisément cette valeur de «constante et définitive». D'après les expériences acquises par des chercheurs antérieurs, on serait plutôt disposé à regarder comme constant le potentiel mesuré le jour suivant; que ce potentiel soit trop élevé, c'est autre chose, et ainsi que je le démontrerai à l'article D, ce fait tient à ce que le liquide expérimenté cède de l'acide carbonique à l'atmosphère d'hydrogène.

D'après tout ce que j'ai pu voir, je ne doute nullement que la constance des valeurs qui dans l'essai ci-dessus cité ont été mesurées entre 1^{30} et 2^{00} — constance qui incontestablement semble avoir duré pour le moins une demi-heure —, ne soit uniquement due à cette circonstance que les couches superficielles de sérum avec lesquelles l'électrode est en contact immédiat sont, à ce moment, entrées en équilibre approximatif de diffusion avec l'atmosphère d'hydrogène et d'acide carbonique. Le lendemain, la totalité du sérum examiné étant entrée en équili-

[1]) A l'endroit cité, p. 327.

[2]) Souligné par moi.

bre de diffusion avec l'atmosphère se trouvant au-dessus, on aura obtenu la constance réelle du potentiel, qui sera plus élevé et, par conséquent, correspondra à une réaction sensiblement plus alcaline due à la perte d'acide carbonique éprouvée par le sérum. Quand on demande ainsi à la méthode de Michaelis et Rona une précision poussée à l'extrême, elle exigera, lorsqu'on l'applique à l'examen de liquides renfermant de l'acide carbonique, tout autant de temps que les méthodes anciennes, et elle donnera des résultats de mesurages trop alcalins.

Si, à cause de ces observations et considérations, j'ai dû abandonner la méthode de Michaelis et Rona comme impropre à servir aux buts que je m'étais proposé, je ne m'en rend pas moins parfaitement compte que nous avons dans cette méthode un mode opératoire très rapide et dont la précision sera peut-être suffisante dans d'autres domaines de recherches, particulièrement lorsqu'il s'agit de liquides exempts d'acide carbonique.

Le procédé auquel je me suis arrêté, se laisse déduire de point en point des considérations qui précèdent.

Il s'agit tout d'abord d'accélérer autant que possible la diffusion de gaz entre la liqueur électrolytique et l'atmosphère d'hydrogène qui la surmonte; on y arrive par un procédé extrêmement simple que nous exposerons en A. Si maintenant il s'agit de liquides dépourvus d'acide carbonique (voir plus loin: B et C), le mesurage donnera déjà un résultat exact. Si, par contre, on a à examiner un liquide renfermant de l'acide carbonique, il faut d'abord savoir (D) si, pour en avoir cédé à l'atmosphère d'hydrogène, ce liquide devient plus alcalin ou non. Comme notre essai démontre que cette perte d'acide carbonique ne manque pas de rendre le liquide sensiblement plus alcalin, nous indiquerons en E la modification qu'il convient d'apporter à la méthode pour la rendre applicable au mesurage des liquides renfermant de l'acide carbonique. Enfin nous donnerons en F un certain nombre de mesurages effectués sur le sang, soit d'après la méthode primitive (A), soit d'après la modification indiquée en E.

A. Alors que dans les méthodes anciennes on attend que l'équilibre de diffusion se soit établi spontanément — ce qui dans mes essais a eu lieu au bout de 4 à 8 heures —, mon procédé, au contraire, consiste à accélérer la diffusion en changeant fréquemment la surface, ce qui se fait par secousses ou, plus exactement, en tournant le vase électrolytique, qui at-

taché à son support est tout simplement retiré du circuit pour être tourné à la main environ 200 fois de la position verticale à la position horizontale, et *vice-versa:* le tout peut se faire ordinairement en moins de 2 minutes.

S'il s'agit d'examiner une simple solution, qu'elle soit saturée d'air atmosphèrique, d'oxygène ou d'acide carbonique, on pourra déjà après avoir tourné ainsi 200 fois mesurer le potentiel permanent, qui se montre constant si l'on continue de tourner. Dans le cas du sang il faudra un peu plus de temps pour que l'équilibre soit établi. Généralement il suffira de tourner 600 fois pour obtenir des résultats tout à fait constants.

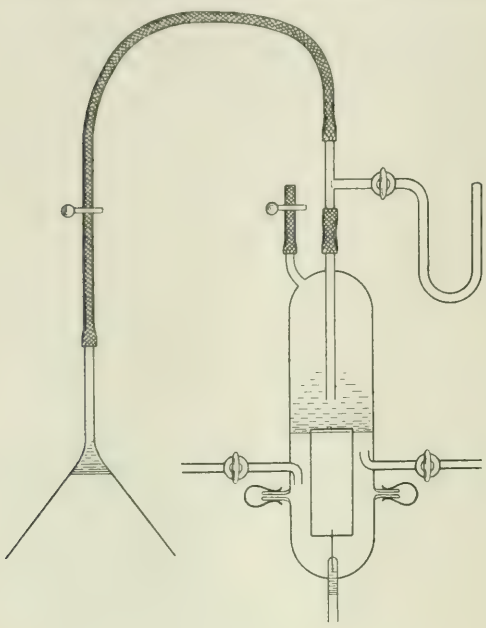


Fig. 2.

La figure ci-après (Fig. 2) donnera une idée de la construction de notre vase électrolytique. Son volume est d'environ 15 cc.; celui de la liqueur servant au mesurage, d'environ 7 cc. Le joint est enduit de vaseline blanche et tenu ensemble au moyen de pinces à ressort. Avant d'effectuer la première mesure, on fait passer pendant une demi-heure environ de l'hydrogène dans le vase vide, afin de saturer l'électrode d'hydrogène à la pression barométrique. Le liquide expérimenté est versé par l'entonnoir dans le vase électrolytique de façon à en expulser une partie de l'hydrogène; le vase n'est rempli de liquide que juste assez pour que l'électrode vienne seulement à en toucher la surface, ou tout au plus à n'y plonger que de quelques millimètres[1]). En même temps on remplit le siphon de liquide expérimenté, et l'on en ferme le robinet.

[1]) Afin de réduire autant que possible les erreurs qui pourraient résulter d'un échange de diffusion défectueux (voir plus haut).

On se met alors à tourner 200 fois le vase fermé (voir plus haut), ensuite on mesure le potentiel et, après avoir tourné encore 200 fois, on fait la vérification du résultat. La lecture du potentiel ne devra se faire que lorsque le liquide aura coulé le long des parois du vase, ce qui dans le cas du sang, prend une minute environ, tandis qu'avec de simples solutions cela se fait en un temps notablement plus court.

Si maintenant il s'agit de mesurer une autre solution, il est préférable — parce que cela fait gagner du temps — d'expulser à une surpression d'hydrogène la solution déjà mesurée, après quoi on emploiera 2 portions de la nouvelle solution pour rincer l'entonnoir, le tuyau, le vase électrolytique et l'électrode. Dans le vase ainsi nettoyé on introduira 7 cc. de la nouvelle solution à mesurer, et ainsi de suite.

Dans les cas où il s'agit de solutions exemptes d'acide carbonique ou de bicarbonates, on peut, ainsi que le montre la figure 2, contrôler les mesures en faisant passer de l'hydrogène à travers le liquide par le tube latéral situé en bas.

J'ai soumis cette méthode à des épreuves variées.

B. Le tableau I contient une série de mesures de mélanges phosphatiques saturés d'air[1]) et dont on connaissait déjà la concentration en ions hydrogène. La concordance avec les potentiels mesurés par Sørensen et ses collaborateurs est très satisfaisante, les écarts ne s'élevant dans aucun cas à 1 millivolt.

Tableau I.

Mélanges de phosphates saturés d'air.

Solution	Min.	Tourné — fois	π Agitation	π Passage d'hydrogène
1.0 phosph. sec.[2])	7	150	0.6776	0.678
2.0 » »	7	150	0.6968	0.697
3.0 » »	2	100	0.7092	0.710
4.0 » »	6	150	0.7203	0.721
5.0 » »	2	100	0.7295	0.730
6.0 » »	2	100	0.7400	0.740
7.0 » »	6	150	0.7504	0.751
8.0 » »	3	100	0.7620	0.7625
9.0 » »	5	100	0.7824	0.783

[1]) C'est-à-dire d'air atmosphérique dépourvu de son acide carbonique.

[2]) «1.0 phosphate sec.» signifie 1 cc. $\frac{\text{mol.}}{15}$ $Na_2HPO_4 + 9$ cc. $\frac{\text{mol.}}{15}$ KH_2PO_4; «2.0 phosph. sec.» signifie 2 cc. de phosphate sec. + 8 cc. de phosphate primaire, etc. (Sørensen: l'endroit cité, p. 68).

Le tableau I indique combien de temps il a fallu, et combien de fois on a dû tourner le vase, pour établir l'équilibre de diffusion et, par suite, la constance du potentiel.

Il va sans dire que toute l'opération de mesurage, y compris la saturation d'hydrogène de l'électrode, le rinçage du vase électrolytique et la vérification de la mesure, demande plus de 2 à 7 minutes; le plus souvent chaque mesurage a exigé 25 minutes, durée qui ne surpasse pas celle que l'essai sur un animal peut permettre.

C. De plus, j'ai recherché si ma méthode donnait aussi des résultats exacts, si on l'appliquait à des solutions saturées d'oxygène.

Essai. 8.4 de phosph. sec. saturé d'oxygène pur.

π	π
Agitations	Passage d'hydrogène
0.7705	0.7705

L'équilibre a été atteint au bout de 15 minutes, en tournant 200 fois.

Au cours de ces déterminations de courte durée, je n'ai observé aucune action dépolarisante de l'oxygène dissous sur l'électrode. Dans la méthode par agitations, l'oxygène dissous dans le liquide ne semble avoir d'influence que comme diluant de l'hydrogène; encore, ainsi que nous l'avons déja indiqué, cette influence est-elle à peine sensible.

D. Enfin j'ai essayé la méthode par agitations en opérant sur des liquides renfermant de l'acide carbonique, liquides qui devraient en être le vrai domaine. Ainsi que le fait remarquer Sørensen[1]), les méthodes utilisées jusqu'à présent ne permettent généralement pas de mesurer électrométriquement la concentration en ions hydrogène dans des liquides contenant de l'acide carbonique ou des bicarbonates, parce que le passage de l'hydrogène amène une expulsion d'acide carbonique et, de ce fait, une diminution de concentration en ions hydrogène. Dans de tels liquides cette concentration ne saurait être déterminée que par colorimétrie et approximativement, et il faut naturellement procéder avec beaucoup de précaution afin d'éviter toute perte d'acide carbonique.

Nous avons maintenant à examiner si, appliquée à des li-

[1]) A l'endroit cité, p. 54.

quides renfermant de l'acide carbonique ou des bicarbonates, la méthode par agitations fait céder de l'acide carbonique en quantité appréciable à l'atmosphère d'hydrogène, et si, par suite, elle donne des valeurs «trop alcalines». Les essais dont les résultats sont consignés dans le tableau II, donneront la réponse à cette question.

Tableau II. $\frac{\text{Mol.}}{10}$ $NaHCO_3$.

	Exposant des ions hydrogène[1]) p_H^+		
	Méthode par agitations	Méthode par colorimétrie avant électrométrie	Méthode par colorimétrie après électrométrie
Solution, directement	8.47	*8.32*	8.47
De même.	8.45	*8.30*	8.49
Solution, 45′ dans courant d'air	8.64	8.60	8.68
» 90′ » » »	8.78	8.72	8.74
» 120′ » » »	9.14	9.20	9.17
» » » » »	8.95	8.91	8.91
» + parties égales de 6,0 phosph. sec. saturé de CO_2 .	6.85	*6.57*	6.93

Ce tableau montre très nettement que, pendant le cours de la détermination électrique, une solution de bicarbonate sodique acquiert une alcalinité notablement plus élevée parce qu'elle cède de l'acide carbonique à l'atmosphère d'hydrogène; p_H^+ monte de 8.32 à 8.47, la concentration en ions hydrogène tombe de $10^{\div 8.32}$ à $10^{-8.47}$ ou, autrement dit, de $0.48 \times 10^{\div 8}$ à $0.34 \times 10^{\div 8}$. Dans le mélange de bicarbonate et de phosphate, mélange saturé d'acide carbonique, p_H^+ monte considérablement aussi: de 6.57 à 6.85, c'est-à-dire que la concentration en ions hydrogène tombe de 0.27×10^{-6} à $0.14 \times 10^{\div 6}$. Par contre, en ce qui concerne les solutions de bicarbonate aérées, c'est-à-dire traversées par un courant d'air débarrassé d'acide carbonique, et qui, de ce fait, contiennent aussi bien du monocarbonate que du bicarbonate, on voit qu'elles n'ont pas éprouvé de perte mesurable en ions hydrogène, lorsqu'on les met en équilibre de diffusion par rapport à l'hydrogène qui les surmonte.

Le mesurage électrométrique terminé, la solution utilisée étant transvasée avec précaution dans une éprouvette fut mesurée

[1]) A la concentration en ions hydrogène $10 \div p$ nous substituons ici, suivant la proposition de Sørensen, l'exposant des ions hydrogène $p_H^+ = p$.

par colorimétrie. La concordance entre les exposants d'ions hydrogène déterminés suivant les deux méthodes (première et troisième colonnes du tableau II) se trouve parfaitement satisfaisante.

E. Après avoir ainsi constaté que l'échange de diffusion entre l'hydrogène et le liquide contenant de l'acide carbonique donne lieu à une modification de la réaction dans la direction alcaline, il était tout naturel de chercher à éliminer l'erreur ainsi produite, en agissant de la manière que je vais décrire. Une fois le liquide mis en équilibre de diffusion à l'égard de l'atmosphère d'hydrogène — il faut ordinairement, à cet effet, tourner 200 fois —, la portion utilisée du liquide expérimenté est remplacée par une nouvelle portion, tout en gardant l'atmosphère d'hydrogène et d'acide carbonique. On y parvient sans aucune difficulté en faisant usage de l'appareil indiqué (fig. 2): on n'a qu'à remplir l'entonnoir de 7 cc. environ du liquide à étudier, pour ouvrir ensuite les deux pinces; s'il y a lieu, on peut répéter ces manipulations une ou deux fois[1]). L'acide carbonique du liquide expérimenté fera alors approximativement équilibre à celui de l'atmosphère se trouvant au-dessus, et quant à l'hydrogène, l'équilibre s'établit aussi rapidement et avec autant de facilité, mais cette fois sans perte d'acide carbonique.

A la vérité, la pression partielle exercée par l'hydrogène sur l'électrode sera de ce chef un peu plus basse, mais étant donné que le potentiel mesuré change avec le logarithme de la pression de l'hydrogène, il s'ensuit que ce fait n'entraîne qu'une erreur fort minime. Trois essais que j'ai faits en vue de déterminer ce pourcentage d'hydrogène au-dessus du sang à 39^0 après établissement de l'équilibre de diffusion, ont conduit aux chiffres suivants: 94.1, 94.0 et 95.6 pour cent d'hydrogène. Un simple calcul fait constater que cela donne lieu à des erreurs positives de 0.8, de 0.8 et de 0.7 millivolt, erreurs qui dans la plupart des cas n'ont aucune importance, et qui d'ailleurs peuvent être éliminées par une simple correction, si les circonstances le rendent nécessaire.

Le tableau III démontre l'accord atteint de cette manière entre les déterminations électrométriques et colorimétriques de la concentration en ions hydrogène de liquides renfermant de l'acide carbonique et des bicarbonates.

---

[1]) Afin d'éviter que de l'acide carbonique s'échappe de la surface du liquide, on peut naturellement remplacer l'entonnoir ouvert par une seringue en verre.

Tableau III.

	p_H^+ Méthode par agitations Sol. renouv. 3 fois	p_H^+ Par colorimétrie
$\frac{Mol.}{10}$ $NaHCO_3$	8.30	8.34
$\frac{Mol.}{10}$ $NaHCO_3$ + parties égales de 6.0 phosph. sec. saturé d'acide carbonique	6.58	6.61
De même	6.63	6.60

En opérant ainsi, il est possible de mesurer par électrométrie, rapidement et avec précision, la concentration ionique de liquides renfermant de l'acide carbonique et des bicarbonates.

F. Sur du sang dont la température était celle du laboratoire, j'ai effectué les déterminations ci-dessous, qui me semblent démontrer que — d'accord avec ce qui a été établi par mes expériences précédemment décrites — les mesurages jusqu'ici exécutés par d'autres expérimentateurs en présence d'une atmosphère d'hydrogène en repos sur du sang également en repos, ont donné, et ont forcément dû donner, des valeurs trop alcalines.

J'ai expérimenté sur du sang de bœuf défibriné dans une boîte en verre renfermant des galets de verre et que j'ai remplie presque entièrement avec le sang à étudier. Au moyen d'une pipette j'ai enlevé directement à cette boîte la portion de sang que je me proposais d'utiliser. J'ai ainsi pris soin d'éviter, dans la mesure du possible, une perte d'acide carbonique. D'après le tableau IV, le sang traité de cette façon présente à la température ambiante de 18° à 20° une concentration en ions hydrogène qui, mesurée au moyen de la méthode par agitations, peut s'exprimer par les chiffres suivants: *sans* renouvellement $10^{-7.47} = 0.34 \times 10^{-7}$; *avec* renouvellement: $10^{-7.37} = 0.43 \times 10^{-7}$. D'après ce qui a été dit plus haut, il ne peut guère y avoir de doute que ce ne soit ce dernier chiffre — notablement, de 30 pour cent environ, plus élevé que le premier — qui soit le plus exact. Il est vrai de dire que ces mesures ne se laissent pas sans autre appliquer au sang vivant, en circulation.

L'augmentation de la concentration en ions hydrogène paraît être la même, que le sang ait été renouvelé 1, 2, 3 ou 4 fois[1]).

Tableau IV. Sang de bœuf défibriné.

	p_H^+ Méthode par agitations		
	sans renouvellem.	avec renouvellem.[1])	le sang renouvelé n fois[1])
Sang tiré le 8 oct. 1910.	7.45	—	—
» » » 10 » » .	7.47	—	—
De même	7.46	—	—
De même	7.43	—	—
De même le 12 oct. 1910.	7.46[3])	—	—
Sang tiré le 24 » » .	7.46	7.37	3
De même	7.45	7.36	3
Sang tiré le 26 oct. 1910.	7.52	7.37	1
De même	7.47	7.40	3
De même	7.53	7.43	2
De même 28 oct. 1910. .	7.50	7.35	4
De même	7.47	7.33	2
Moyenne.	*7.47*	*7.37*	

Les mesures à faire à la température du corps et dans des conditions expérimentales variées sur du sang enlevé directement à l'animal, sont déjà en cours.

Résumé.

Dans ce mémoire nous donnons une méthode permettant de déterminer par électrométrie, rapidement et avec précision, la concentration en ions hydrogène de solutions renfermant de l'air atmosphérique, de l'oxygène et de l'acide carbonique. Cette méthode peut également s'appliquer au sang; les résultats de nos mesurages semblent indiquer que les déterminations faites par mes prédécesseurs sur le sang ont pour la plupart donné une concentration trop basse en ions hydrogène.

[1]) En d'autres termes, que la portion de sang ait été remplacée 1, 2, 3 ou 4 fois par une nouvelle portion après l'établissement de l'équilibre de diffusion (voir E).

[2]) Après 2 heures d'aération avec de l'air atmosphérique exempt d'acide carbonique: $p_H^+ = 7.66$.

SUR LE MESURAGE ET LA GRANDEUR DE LA CONCENTRATION EN IONS HYDROGÈNE DE L'EAU SALÉE[1]

PAR

SVEN PALITZSCH.

Aperçu historique.

A la suite des recherches suivies qui ont été faites ces dernières années sur la mer, sa faune et sa flore, les connaissances de la nature chimique et physique de l'eau de mer ont pris un nouvel intérêt, parce qu'il a été reconnu que les actions vitales des animaux marins sont influencées à un haut degré par des modifications même très minimes dans la composition et l'état de l'eau où vivent ces animaux.

En ce qui concerne plus particulièrement l'influence prépondérante qu'exerce la concentration en ions hydrogène sur les processus biologiques ayant lieu dans l'eau de mer, elle ressort très nettement des nombreuses expériences effectuées par Loeb sur l'évolution des œufs de divers animaux marins. Comme un exemple caractéristique[2]) nous pouvons citer ce fait que, d'un côté, le développement parthénogénésique des œufs de Strogylocentrotus ne réussissait que bien imparfaitement dans l'eau relativement acide prise dans l'océan Pacifique (Pacific Grove), et que, de l'autre côté, celle de la mer Atlantique (Woods Hole) donnait toujours un développement abondant de larves. L'eau de cette dernière mer se colorait légèrement en rouge avec la phénolphtaléine, tandis que celle de l'océan Pacifique n'en était pas colorée et qu'avec le rouge neutre elle prenait une teinte orange. La concentration en ions hydroxyle de cette dernière eau est évaluée

[1]) Un exposé élémentaire de l'importance de la concentration en ions hydrogène ainsi que des principes qui président au mesurage colorimétrique de cette concentration, a été donné dans les «Publications de Circonstance», éditées par le Conseil permanent international pour l'exploration de la mer, N° 60, et dans le rapport de l'expédition du *Thor*.

[2]) Pflügers Archiv **118**, 186 (1907).

par Loeb à $10^{\div 6}$ (équivalents-grammes d'hydroxyle sous forme d'ions par litre), donc la concentration en ions hydrogène à $10^{\div 8}$. En ajoutant à l'eau de Pacific Grove quelques centimètres cubes d'une solution d'hydroxyde de sodium étendue, cette eau était rendue très propre au développement des œufs.

L'importance qu'a la concentration en ions hydrogène pour des phénomènes biologiques dans l'eau de mer d'un tout autre ordre a été établie de même. En effet, pour les mouvements rythmiques des méduses, Bethe[1]) a trouvé que, lorsque la concentration en ions hydrogène s'accroît de $10^{\div 8}$ à $10^{\div 7}$ ou $10^{\div 6}$, ces mouvements seront accélérés, tandis qu'une concentration de $10^{\div 5}$ ou de $10^{\div 9}$ les diminuera ou même les paralysera.

Dans l'eau salée des aquariums napolitains[2]) la concentration en ions hydrogène serait selon Bethe de $10^{\div 8}$ environ parce que, de même que l'eau examinée par Loeb et prise dans le Grand-Océan (voir plus haut), elle prend la teinte orange en présence du rouge neutre et qu'elle n'est pas colorée par la phénolphtaléine.

Bien avant les biologistes, les hydrographes avaient dirigé leur attention sur le mesurage de la réaction de l'eau de mer. C'est ainsi que plusieurs savants: v. Bibra[3]), Guignet et Telles[4]) et Tornøe[5]), avaient déjà trouvé, il y a longtemps, que l'eau de mer accusait une réaction nettement bien que faiblement alcaline. Plus tard Natterer[6]) a observé que l'eau de la partie est de la mer Méditerranée se colore en rouge par la phénolphtaléine, et en comparant les teintes rouges il a constaté que l'eau du fond est moins alcaline que celle de la surface. Ruppin[7]) estime que l'eau de mer n'est pas colorée par la phénolphtaléine, opinion qui tient probablement à ce qu'il n'a examiné que de l'eau de la mer du Nord et de la Baltique au voisinage de Kiel.

Ringer[8]), qui est le premier ayant mesuré quantitativement

---

[1]) Pflügers Archiv **127**, 261 (1909).
[2]) Pflügers Archiv **127**, 256 (1909).
[3]) Liebigs Annalen **77**, 90 (1851).
[4]) Compt. rend. de l'Acad. des sciences **83**, 920 (1876).
[5]) Den norske Nordhavsekspedition 1876—1878, **1**, 27 (1880).
[6]) Denkschr. der kais. Acad. d. Wiss., math.-naturw. Classe, Bd. **59**, Ber. der Comm. für Erforschung des östlichen Mittelmeers, p. 83 (1892), et **60**, p. 54 (1893).
[7]) Wissenschaftl. Meeresuntersuchungen. Kiel. Neue Folge. **11**, p. 281 (1909).
[8]) Verhandelingen uit het Rijksinstituut voor het onderzoek der zee (1908).

la réaction de l'eau salée et qui a effectué de nombreuses mesures électrométriques d'eau de la mer du Nord ainsi que du Zuydersée et du Fiord Bömmel, a trouvé que ces eaux étaient faiblement alcalines; la concentration en ions hydrogène se trouvait comprise entre $0{,}58 \times 10^{-8}$ et $1{,}40 \times 10^{-8}$. Avant d'être mesurés, les échantillons d'eau examinés avaient été pendant quelque temps conservés dans des bouteilles, ce qui, ainsi que nous le verrons plus loin, peut occasionner une modification appréciable dans la concentration ionique. Etant donné que l'eau de mer contient une quantité notable de bicarbonates et d'acide carbonique libre, on ne peut pas lors du mesurage électrométrique faire passer un courant d'hydrogène parce qu'alors l'acide carbonique serait expulsé et que, de ce fait, l'eau deviendrait plus alcaline. C'est pourquoi, après avoir rempli le vase électrolytique entièrement avec l'échantillon d'eau à examiner, Ringer, faisant écouler une partie de l'eau, fait entrer une quantité d'hydrogène telle que la plus grande partie de l'électrode en soit entourée. En agissant ainsi, on évite d'éliminer l'acide carbonique, il est vrai[1]), mais il faut beaucoup de temps pour arriver à ce que la tension électrique atteigne la grandeur correspondant à la concentration ionique; Ringer fait durer un mesurage vingt-quatre heures.

La détermination peut être effectuée d'une manière bien plus rapide et plus commode à l'aide de la méthode colorimétrique telle qu'elle a été élaborée et décrite par S. P. L. Sørensen dans ses Etudes enzymatiques II[2]) et que, spécialement dans le but de servir à l'examen des eaux salées, elle a été perfectionnée et vérifiée par le même auteur avec la collaboration de Palitzsch[3]). Cette méthode, qui est basée sur ce fait que la couleur des indicateurs change, et ce d'une façon graduelle, avec la concentration en ions hydrogène du milieu, permet d'effectuer une détermination réellement quantitative de la concentration

[1]) Toutefois il est inévitable qu'une partie, si petite soit-elle, de l'acide carbonique monte dans l'hydrogène, ce qui donnera lieu à une erreur. Grâce à un procédé élaboré récemment par K. A. Hasselbalch dans le laboratoire de Carlsberg, il est pourtant devenu possible de mesurer très exactement par électrométrie même des liquides riches en acide carbonique: Comptes-rendus des Travaux du Laboratoire de Carlsberg **10**, 64 (1911), Biochemische Zeitschrift **30**, 317 (1910).

[2]) Ces mêmes Comptes-rendus **8**, 1 (1909).

[3]) Ces mêmes Comptes-rendus **9**, 8 (1910).

ionique de l'eau salée en s'aidant de certaines liqueurs de comparaison. Ainsi qu'il a été mentionné dans les Etudes enzymatiques II, on se sert à cet effet de solutions de certaines substances de composition peu complexe et qu'on peut facilement préparer à l'état suffisamment pur, solutions dont la concentration en ions hydrogène peut être aisément et avec précision établie par voie électrométrique.

Au moyen d'un réactif indicateur convenable on colore un échantillon de l'eau ainsi qu'un certain nombre de liqueurs de comparaison, dont la concentration ionique se rapproche de celle de l'eau en question; en comparant les différentes teintes on trouvera alors sans difficulté la liqueur de comparaison ayant la même ou à peu près la même concentration ionique que l'eau à examiner.

Etant donné que l'eau de mer est, pour ainsi dire, incolore et qu'elle ne contient pas de matières colloïdales, elle se prête éminemment au mesurage colorimetrique; seulement sa forte teneur en sels aura pour effet que la soi-disant «erreur de sel» jouera un rôle prépondérant. La plupart des indicateurs, en effet, changent de teinte à la suite d'une addition abondante de sel, ce qui tient non seulement à ce que ce dernier entraîne une modification de la concentration ionique, mais aussi à ce fait que la couleur de presque tous les indicateurs est influencée par les sels indépendamment de l'effet des ions hydrogène. Cependant, comme la plus grande partie des sels de l'eau de mer est constituée par le chlorure de sodium, et que la proportion existant entre ces sels reste à bien peu près constante même si la teneur en ceux-ci varie, on pourra dans ce cas surmonter cette difficulté en recherchant une correction qu'il faut ajouter au p_H^+ trouvé[1]), ou en soustraire, pour arriver au p_H^+ réel. En comparant les valeurs établies par mesurage électrométrique avec celles obtenues pour une même eau de mer suivant la méthode colorimétrique, S. P. L. Sørensen et S. Palitzsch ont trouvé l'erreur de sel pour les indicateurs suivants: phénolphtaléine, α-naphtolphtaléine, rouge neutre et p-nitrophénole, et ils ont rassemblé les corrections en forme de tableaux synoptiques.

---

[1]) p_H^+ est la valeur numérique de l'exposant de la puissance de 10 qui indique le nombre d'équivalents-grammes d'hydrogène contenu sous forme d'ions dans chaque litre (voir ces mêmes Comptes-rendus **8**, 28 (1909)).

En même temps S. P. L. Sørensen et S. Palitzsch ont déterminé la concentration en ions hydrogène dans une centaine d'échantillons d'eau de mer qui, pendant le temps qui s'était écoulé depuis la prise, avaient été conservés dans des bouteilles bouchées. Ils insistent cependant sur ce fait que leurs déterminations ne font pas connaître la concentration des ions hydrogène qu'avaient les échantillons au moment de la prise. Des échantillons doubles montraient des concentrations très divergentes, et laissés en repos dans des bouteilles à demi remplies les échantillons devenaient rapidement plus alcalins.

En effet, ce qui a la plus grande importance pour la concentration en ions hydrogène de l'eau de mer, ce sont sans conteste les conditions d'équilibre et de dissociation de l'acide carbonique et des sels de chaux. Il est vrai que les carbonates et les bicarbonates font fonction de «tampons« (c'est-à-dire qu'une addition d'acide ou de base à une solution de ces corps modifie la concentration ionique beaucoup moins que ne le fait la même addition faite à l'eau pure), de sorte que dans la nature la concentration ionique ne subit guère de modifications quoique la proportion d'acide carbonique augmente par suite de la respiration des animaux et qu'elle diminue au contact de l'atmosphère; mais du moment qu'on prélève un échantillon d'eau de mer, la quantité de tampon contenue dans ce volume d'eau séparé sera bien loin de suffire pour maintenir constante la concentration des ions hydrogène. Déjà après deux ou trois jours, la plupart des échantillons seront devenus alcalins. Il ressort nettement de ceci ainsi que des mesures ci-dessus, combien il est nécessaire d'opérer les mesurages immédiatement après la prise de l'échantillon.

B. Mesures de la concentration en ions hydrogène de l'eau de mer effectuées au cours de la croisière du vapeur «Thor»[1].

Lors de la croisière de cinq mois (été 1910) que fit à l'archipel de Féroé, à la mer Atlantique et à la Méditerranée, le vapeur *Thor* appartenant à l'Etat danois et destiné principalement aux recherches océanographiques, il a été possible d'exécuter des déterminations de la concentration en ions hydrogène

[1]) Un exposé détaillé des chiffres trouvés a été publié dans le rapport de l'expédition.

de l'eau de mer à bord et immédiatement après que le puisoir d'eau avait été monté, ainsi que dans ce qui précède nous l'avons dit être nécessaire pour obtenir des résultats sûrs.

Pour ces recherches on employait la méthode de mesurage colorimétrique parce que, comme nous l'avons expliqué plus haut, elle s'applique d'une façon rapide et commode à bord même quand la mer est grosse, alors que la méthode électrométrique exige un dispositif complexe et monté sur une base insensible aux secousses, ce qui rend cette méthode inapplicable à bord. Comme réactifs indicateurs on employait la phénolphtaléine et la naphtolphtaléine, comme liqueurs de comparaison, des mélanges de solutions de borates et d'acide chlorhydrique. Les p_H^+ cités dans la suite ont été corrigés relativement aux erreurs de sel (voir le chapitre C).

Des mesures faites au cours de la croisière il résulte que, d'une façon générale, la variation de la concentration en ions hydrogène n'était guère considérable, mais pourtant facilement constatable. La valeur la plus basse que nous avons observée pour p_H^+ était de 7,95 (abstraction faite de la mer Noire); la valeur la plus élevée de 8,35.

Pour l'eau de surface du Skager-Rack, celle de la partie sud de la mer du Nord et celle de la partie ouest de la mer Baltique, on a trouvé un p_H^+ inférieur à 8,08 (ordinairement compris entre 8,00 et 8,05). Cette eau ne se colore donc pas par la phénolphtaléine. Dans la mer du Nord l'eau de surface était un peu plus alcaline: p_H^+ se trouvait entre 8,08 et 8,13; à la hauteur de Murray Firth, à vingt milles de la côte, p_H^+ s'élevait toutefois de 8,15 à 8,18. Dans l'océan Atlantique p_H^+ monta du nord au sud; dans la partie la plus septentrionale la valeur de p_H^+ était pareille à celle constatée dans la mer du Nord, excepté dans un fiord: Vaag Fjord (Féroé), à l'eau très riche en oxygène, où p_H^+ s'est trouvé égal à 8,22 à 8,24. Dans le golfe de Biscaïe et le long de la côte du Portugal, p_H^+ s'élevait à 8,25, qui est la valeur moyenne de l'eau de surface de la Méditerranée, avec cette restriction pourtant que l'eau de la partie est est la plus alcaline (p_H^+ égal à 8,27 environ). Tous les échantillons d'eau de surface de la Méditerranée se coloraient donc nettement en rouge par la phénolphtaléine[1]). L'eau la

[1]) En effet, une eau contenant environ 35 ‰ de sel et dont le p_H^+ est supérieur à 8.06, est colorée en rouge par la phénolphtaléine.

plus alcaline avait été prise dans la mer de Marmara, le Bosphore et la mer Noire, et à ces endroits-là p_H^+ à la surface s'est trouvé égal à 8,35 environ.

A quelques rares exceptions près, la concentration en ions hydrogène augmentait — et p_H^+ diminuait — a mesure que de la surface on allait vers le fond. Le passage de la valeur relativement élevée de p_H^+ de la surface a la valeur plus basse de l'eau du fond, était généralement graduel et insensible; pourtant les plus fortes différences pour une même différence de profondeur se trouvaient dans les couches supérieures.

A titre d'exemple nous allons citer quelques mesures faites sur la Méditerranée, l'océan Atlantique, la mer du Nord et la mer Noire:

Dans la Méditerranée on a trouvé par exemple à 40°05'N —11°31'E (entre la Sardaigne et l'Italie) les valeurs suivantes de p_H^+:

Profondeur en mètres.	0	50	100	200	400	800
p_H^+	8.23	8.23	8.21	8.19	8.19	8.17
Profondeur	1000	1200	1500	2000	2500	3200
p_H^+	8.14	8.14	8.12	8.09	8.07	8.07

Presque partout au fond de la Méditerranée, on a trouvé p_H^+ oscillant de 8,07 à 8,09, de sorte que l'eau était encore si alcaline qu'elle pouvait tout juste être colorée faiblement par une forte dose de phénolphtaléine.

Dans l'océan Atlantique, à 41°32'N—9°32'O (à l'ouest de la province portugaise de Minho), les chiffres étaient comme suit:

Profondeur	0	50	100	400	800	1000	1200	1500	2000
p_H^+	8.22	8.18	8.13	8.04	8.01	8.01	7.98	7.95	7.95

Dans la mer du Nord à l'est de l'archipel de Féroé, à 61°27'N—6°28'O, l'eau glacée du fond (température de $\div 0°,27$) accusait contre toute attente une alcalinité telle que p_H^+ était égal à 7,98. Comme moyennes d'un certain nombre de mesures on a trouvé:

Profondeur	0	100	200	400	600	700
p_H^+	8.13	8.09.	8.08	8.03	8.01	7.98

Quant à l'eau de la mer Noire, elle se distingue de presque toutes les autres eaux de mer par ce qu'aux profondeurs

plus grandes que 180 mètres elle contient de l'acide hydrosulfurique. Par suite, il était à présumer que cette eau était plus acide que l'eau de mer ordinaire, prévision qui s'est trouvée justifiée par les résultats. Les échantillons pris à 800 et à 1000 mètres de profondeur (nous n'avons fait des recherches que sur un seul point de la mer Noire) ont été mésurés immédiatement tant au moyen du rouge neutre que de la naphtolphtaléine, et montraient p_H^+ égal à 7.26 environ. Cette eau, la plus acide de toutes celles examinées au cours de notre expédition, est donc toujours plus alcaline qu'une solution neutre dont le p_H^+ est, comme l'on sait, 7.07. Comme les échantillons furent recueillis la nuit et que, aussi bien avec le rouge neutre qu'avec la naphtolphtaléine, la coloration dans des liquides ayant p_H^+ égal à env. 7.3 va de l'orange au jaune — teinte qu'on ne peut guère apercevoir à la lumière artificielle —, la mesure ne pouvait pas être tout à fait exacte. Le lendemain matin, dans les échantillons provenant des plus grandes profondeurs (1000—800—600 mètres) il était apparu un dépôt blanc, et les échantillons étaient alors devenus plus alcalins; car mesurés au moyen de la naphtolphtaléine ils accusaient une valeur de p_H^+ égale à 7.80; les autres échantillons étaient parfaitement limpides et donnaient pour résultats:

Profondeur	0	10	25	50	75	85	100	200	300	400
p_H^+	8.34	8.25	8.19	8.15	8.03	7.99	7.86	7.67	7.55	7.53

Les chiffres trouvés ne semblent montrer aucun rapport bien net entre la proportion d'oxygène et la concentration en ions hydrogène, ni même entre celle-ci et la température ou la teneur en chlore. Toutefois, dans quelques endroits, on a pu observer certains faits qui pouvaient faire soupçonner qu'une forte proportion d'oxygène est accompagnée d'une valeur élevée de p_H^+ (réaction fortement alcaline); mais on n'a pu établir aucune règle générale. Malheureusement, je n'ai pas déterminé la tension d'acide carbonique et l'alcalinité dans les échantillons d'eau examinés au cours de la croisière; il est fort probable qu'entre ces deux facteurs et la grandeur de la concentration en ions hydrogène il existe une relation de cause à effet.

Comme on le voit, les concentrations en ions hydrogène

trouvées lors de l'expédition du *Thor* concordent très bien avec les résultats des recherches mentionnées dans notre aperçu historique.

Ringer (v. p. 86) trouva des concentrations allant de $0.58 \times 10^{\div 8}$ à $1.40 \times 10^{\div 8}$, valeurs qui, exprimées en p_H^+, équivalent à 8.24 à 7.86 et qui, par conséquent, ne diffèrent que fort peu de celles établies par nos recherches, qui portaient cependant sur des eaux pour la plupart très différentes et ayant été puisées bien loin des parages où les échantillons examinés par Ringer avaient été pris.

Alors que, ainsi que nous l'avons vu, les mesurages faits à bord immédiatement après la prise de l'échantillon ont donné pour p_H^+ des valeurs comprises entre 7.95 et 8.35, ceux effectués par S. P. L. Sørensen et S. Palitzsch sur des échantillons d'eau à peu près pareils rapportés au pays et puis conservés pendant un certain temps accusaient des concentrations en ions hydrogène même supérieures à celles des solutions neutres. Cette augmentation de la concentration des ions hydrogène s'est donc produite pendant la conservation, et dans les échantillons qui ont fourni des résultats à peu près justes, elle a probablement été contrebalancée par la circonstance que le verre a cédé des matières alcalines.

Etant donné que l'eau de mer a un contact si intime avec les organismes de la mer et que non seulement elle les entoure de ses flots, mais qu'elle traverse leurs branchies et imprègne en partie les corps des invertébrés, il semble assez justifié de la placer dans la même catégorie que les autres liquides physiologiques. Des déterminations exposées dans ce qui précède il ressort que, de même que ces liquides, l'eau de mer est douée d'une grande capacité[1]) de régler sa concentration en ions hydrogène, bien que cette capacité soit moins prononcée que celle constatée par exemple dans le sang.

Comme pour le sang, il faut tout aussi bien pour l'eau de mer qu'elle soit d'une constitution physique et chimique déterminée pour que les animaux qui y vivent et en vivent puissent prospérer. C'est pourquoi lors d'expériences sur de

[1]) A ce propos nous pouvons mentionner le fait observé par J. Loeb (University of California Publications, Physiology, Vol. **1**, N° 15, p. 139 (1904); Pflügers Archiv **101**, 304 (1904)), à savoir que certaines algues (Ulva), outre qu'elles s'assimilent de l'acide carbonique, sécrètent à la lumière une substance alcaline.

l'eau salée artificielle et lors d'expériences faites dans des aquariums, il est de toute nécessité de procurer et de maintenir pour toute leur durée une concentration bien définie en ions hydrogène, concentration qui n'est pas la même pour les organismes de la surface que pour ceux qui vivent dans les profondeurs. Même si la différence est peu considérable, elle est, comme Loeb et Bethe l'ont démontré, suffisamment grande pour pouvoir exercer une influence prépondérante.

C. Détails relatifs à l'exécution pratique du mesurage de la concentration en ions hydrogène de l'eau de mer.

L'application de la méthode de mesurage par colorimétrie à bord du vapeur *Thor* a pleinement démontré l'excellence de cette méthode. Dans l'exposé détaillé qui va suivre nous nous sommes attaché à indiquer principalement tous les faits importants au point de vue de l'application commode et précise de cette méthode à bord.

La concentration des ions hydrogène des eaux de mer examinées s'étant trouvée comprise entre $p_H^+ = 7.95$ et $p_H^+ = 8.35$, il était suffisant d'employer des mélanges de borates et d'acide chlorhydrique et, comme réactifs indicateurs, la naphtolphtaléine[1]) et la phénolphtaléine (Des mélanges phosphatiques[2]) n'ont été employés que pour les échantillons provenant de la mer Noire et qui contenaient de l'acide sulfhydrique).

Les solutions des réactifs indicateurs étaient préparées en dissolvant $0^{gr}.2$ de naphtolphtaléine ou $0^{gr}.5$ de phénolphtaléine dans 300 cc. d'alcool à 93 %, puis complétant à un demi-litre avec de l'eau.

L'acide chlorhydrique au $^1/_{10}$ avait été étalonné soigneusement sur l'oxalate de sodium.

La solution de borates était préparée en dissolvant 0.2 grammes-molécules d'acide borique ($12^{gr}.404$) dans 100 cc. de solution normale d'hydroxyde de sodium, puis diluant à 1 l. avec de l'eau bouillie.

---

[1]) Ces mêmes Comptes-rendus **9**, 1 (1910). Cette substance colorante est maintenant en vente chez C. A. F. Kahlbaum.

[2]) Pour le mode de préparation, voir ces mêmes Comptes-rendus **8**, 37 (1909).

L'acide borique utilisé remplissait les exigences faites par S. P. L. Sørensen[1]) au point de vue de sa pureté.

Pour les deux solutions on employait de l'eau distillée qui, pour en expulser l'acide carbonique, avait été bien bouillie dans un matras en cuivre étamé. Afin d'éviter, en transvasant la liqueur du ballon jaugé dans la bouteille de conservation, que l'acide carbonique de l'air ne vînt en contact avec la liqueur, on fit traverser le bouchon du ballon par deux tubes, l'un long et l'autre court, de telle façon que l'air de la bouteille de conservation, préalablement débarrassé de son acide carbonique, montât à travers le premier des deux tubes, et que le liquide descendît par le second sans être exposé à l'influence de l'acide carbonique contenu dans l'air extérieur. L'air renfermé dans les ballons, bouteilles et pipettes utilisés avait été dépourvu de son acide carbonique en y faisant passer de l'air qui avait d'abord barboté au travers d'une forte solution d'hydroxyde potassique pour être ensuite lavé à l'eau.

La lessive de soude destinée à la préparation de la solution de borates, lessive qui ne doit pas contenir de carbonates, avait été préparée en dissolvant 100 g. d'hydroxyde de sodium *e natrio* (Kahlbaum) dans 125 cc. d'eau se trouvant dans un cylindre étroit maintenu fermé par un bouchon en verre. La solution s'est trouvée être 17-normale environ; comme dans une lessive aussi fortement concentrée le carbonate de sodium est tout à fait insoluble et se dépose dans l'espace de deux ou trois jours, le liquide limpide qui surnage sera complètement exempt de carbonate et pourra être facilement enlevé au moyen d'une pipette.

Les solutions avaient été préparées à terre. Comparés lors de notre retour, les mélanges employés se sont trouvés n'avoir subi aucune modification sensible. Les bouteilles dans lesquelles les liqueurs de comparaison avaient été conservées étaient fermées par un bouchon de caoutchouc percé de deux trous. Dans un de ces trous passait un tube en verre allant jusqu'au fond et servant au remplissage de la burette, dans l'autre un tube chargé de chaux sodique servant à débarrasser de son acide carbonique l'air entrant dans la bouteille. Les burettes employées remplies par le bas, étaient surmontées d'un tube garni de chaux sodique destiné à priver de son acide carbonique l'air qu'on faisait entrer en vidant la burette.

[1]) Ces mêmes Comptes-rendus **8**, 40 (1909).

Il serait peu commode et souvent même impossible de mélanger des liqueurs de comparaison pendant la navigation. On l'evita en se servant de bouteilles d'une capacité de 150 cc. environ, qu'on remplissait des liqueurs de comparaison lorsque le navire était au port. Le plus souvent on dut employer 5.6—5.7—5.8—6.0—6.2—6.4—6.7—7.0 borate et acide chlorhydrique; 5.6 borate veut dire un mélange de $5^{cc}.6$, de borate et de $(10 \div 5.6 =)$ $4^{cc}.4$ d'acide chlorhydrique. En mesurant 150 cc. à la fois au lieu de 10 cc. par fois, on a obtenu un plus grand degré de précision, parce qu'alors une erreur de $0^{cc}.1$ ne signifiait qu'une modification presque imperceptible de p_H^+. Les bouteilles furent munies d'un bouchon percé de deux trous: dans l'un de ceux-ci on fit passer un petit tube en verre contenant de la chaux sodique granulée, dans l'autre un tube en verre allant jusqu'au fond et dont le bout supérieur fut fermé par un petit tube de caoutchouc et une petite baguette en verre. Lorsqu'on voulait se servir des liqueurs de comparaison, on remplaçait la baguette par une pipette de 10 cc; en remplissant alors la pipette par suction, on forçait l'air ainsi introduit dans la bouteille à passer par le tube à la chaux sodique pour être privé de son acide carbonique. Placées dans une petite caisse de bois, les bouteilles furent fixées avec du fil de cuivre, qui prend moins de place et pèse moins que des cloisons en bois.

Pendant que la comparaison des teintes avait lieu, on plaçait les éprouvettes sur un support arrangé de manière à ce qu'elles fissent un angle de 45^0 env. avec la table. Le dessous du support était couvert de toile cirée d'un blanc lacté afin que les couleurs pussent être regardées sur un fond clair. — Il s'est trouvé nécessaire d'employer de la toile cirée ou du celluloïde, le papier s'abîmant par l'humidité qui est inévitable à bord.

Les éprouvettes étaient tenues fermées par des bouchons de liège afin d'empêcher la poussière d'entrer et, d'autre part, pour éviter l'influence de l'acide carbonique de l'air atmosphérique, influence qui, toutefois, est généralement de peu d'importance pour ce qui concerne l'eau de mer, dont la tension d'acide carbonique est à peu près égale à celle de l'atmosphère. Les éprouvettes, qui étaient faites de verre incolore, avaient des parois minces, et leur diamètre ne variait que fort peu (de 21 à 22 mm.), parce que sans cela la hauteur et l'épaisseur du contenu auraient été si différentes que la comparaison en aurait été rendue très difficile.

Dans l'éprouvette destinée à contenir l'échantillon d'eau de mer avait été gravie, à l'acide fluorhydrique, une marque circulaire à une hauteur telle que l'eau versée dans l'éprouvette jusqu'à cette marque avait un volume de 10 cc. L'eau venait directement du puisoir, et l'on y ajoutait, d'un petit verre à gouttes bouché à l'émeri, 6 gouttes de naphtolphtaléine ou 8 gouttes de phénolphtaléine. Après avoir placé l'éprouvette entre les liqueurs de comparaison, on procéda alors à la détermination colorimétrique suivant le mode habituel[1]). L'erreur à laquelle ce procédé peut avoir donné lieu, n'aura probablement pas dépassé $\pm$ 0.04 dans la valeur de p_H^+.

Après avoir déterminé quelle était la liqueur de comparaison ayant la teinte la plus rapprochée de celle de l'eau examinée, on trouvait le p_H^+ de cette dernière au moyen des tableaux I et II[2]), où les valeurs des p_H^+ des liqueurs de comparaison, valeurs corrigées relativement aux erreurs de sel (comp. A.) se trouvent calculées pour 35 °/₀₀ et 20 °/₀₀ de sel. La plus grande correction étant de 0.22 (35 °/₀₀ de sel), il est certain que l'extrapolation et l'interpolation effectuées ont fait obtenir un degré de précision suffisant.

Tableau I.

Mélanges de borates; α-naphtolphtaléine.

Composition du mélange de borates	Exposant des ions hydrogène, p_H^+, du mélange boratique		
	non corrigé	corrigé en vue de l'erreur de sel de l'indicateur	
		35 °/₀₀ de sel (corr. = ÷ 0.22)	20 °/₀₀ de sel (corr. = ÷ 0.17)
5 cc. 25 de borate + 4 cc. 75 de HCl . .	7.62	7.40	7.45
5 cc. 3 » » + 4 cc. 7 » » . .	7.71	7.49	7.54
5 cc. 4 » » + 4 cc. 6 » » . .	7.84	7.62	7.67
5 cc. 5 » » + 4 cc. 5 » » . .	7.94	7.72	7.77
5 cc. 6 » » + 4 cc. 4 » » . .	8.03	7.81	7.86
5 cc. 8 » » + 4 cc. 2 » » . .	8.17	7.95	8.00
6 cc. 0 » » + 4 cc. 0 » » . .	8.29	8.07	8.12

[1]) Voir ces mêmes Comptes-rendus **8**, 67 (1909).
[2]) Ces mêmes Comptes-rendus **9**, 21 (1910).

Tableau II.

Mélanges de borates; phénolphtaléine.

Composition du mélange de borates	Exposant des ions hydrogènes, p_H^+, du mélange boratique		
	non corrigé	corrigé en vue de l'erreur de sel de l'indicateur	
		35 ‰ de sel (corr. = ÷ 0.21)	20 ‰ de sel (corr. = ÷ 0.16)
6 cc. 0 de borate + 4 cc. 0 de HCl . .	8.29	8.08	8.13
6 cc. 25 » » + 3 cc. 75 » » . .	8.41	8.20	8.25
6 cc. 5 » » + 3 cc. 5 » » . .	8.51	8.30	8.35
6 cc. 75 » » + 3 cc. 25 » » . .	8.60	8.39	8.44
7 cc. 0 » » + 3 cc. 0 » » . .	8.68	8.47	8.52
7 cc. 25 » » + 2 cc. 75 » » . .	8.74	8.53	8.58
7 cc. 5 » » + 2 cc. 5 » » . .	8.80	8.59	8.64
8 cc. 0 » » + 2 cc. 0 » » . .	8.91	8.70	8.75

A M. le Professeur et Dr S. P. L. Sørensen, mon très honoré maître, qui m'a gracieusement donné le temps et l'occasion d'exécuter les recherches ci-dessus relatées, j'adresse publiquement ici mes remerciements les mieux sentis pour l'aide qu'il m'a prodiguée.

Je tiens également à remercier M. le Dr Johs. Schmidt pour m'avoir fourni, au cours de la croisière du *Thor* en 1910, l'occasion de faire l'essai de la méthode colorimétrique pour la détermination de la concentration en ions hydrogène de l'eau de mer.

Juin 1911.

METHODE POUR RECONNAÎTRE LA PRÉSENCE DE PETITES QUANTITÉS D'ALCOOL DANS DES LIQUIDES EN FERMENTATION ET QUELQUES RÉSULTATS QU'ELLE A PERMIS D'OBTENIR

PAR

ALB. KLÖCKER.

PARMI les caractères systématiques des champignons de levure, leur action sur les diverses espèces de sucre en est l'un des plus importants. Pour la déterminer, on ensemence la levure dans une solution du sucre considéré, par ex., dans de l'eau de levure, et l'on observe alors s'il s'y produit des phénomènes de fermentation. Si oui, on pourra facilement constater la présence d'alcool et, par conséquent, la levure possède le pouvoir de faire fermenter le sucre en question. Si, par contre, l'on ne remarque pas de phénomène de fermentation, il peut cependant se faire que la levure ait néanmoins la capacité de faire fermenter des doses minimes du sucre expérimenté, et, en ce cas, il peut être assez difficile de démontrer une formation d'alcool, puisque alors il ne s'agit que de doses infimes de celui-ci. De là proviennent les opinions contradictoires qu'on rencontre dans la littérature. Inutile d'insister sur ce fait évident que, pour arriver à un résultat sûr, il est indispensable de toujours opérer sur des sucres chimiquement purs.

Dans le Laboratoire de Carlsberg, Emil Chr. Hansen[1]) introduisit le caractère de larmes ou de stries indiqué par Pasteur pour reconnaître la présence d'alcool dans les liquides qui fermentent. C'est un procédé d'une extrême précision, et il y

[1]) Comptes-rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg **1**, 175 (1881).

a lieu de s'étonner qu'il n'en soit pour ainsi dire jamais fait mention dans la bibliographie chimique. C'est ainsi que les ouvrages classiques de Beilstein, d'Abderhalden et de Hoppe-Seyler ne le citent point. Par contre, cette réaction a été décrite par Duclaux, élève de Pasteur, dans sa «Chimie biologique», 1883, p. 234, et dans son «Traité de Microbiologie», **3**, 6 (1900), et Duclaux en fait ressortir à juste titre les grands avantages.

Dans son «Examen critique d'un écrit posthume de Claude Bernard sur la fermentation», 1879, p. 90, Pasteur fait la description de ce procédé. Il écrit textuellement ce qui suit:

«Je me souviens que dans le courant de l'année 1877, pendant une des séances de l'Académie, Bernard nous consulta, M. Berthelot et moi, sur la manière de reconnaître la présence de petites quantités d'alcool. M. Berthelot lui indiqua la réaction de Lieben, par la formation de l'iodoforme, lorsque l'alcool est mis en contact de l'iode et d'un alcali. De mon côté, je lui parlai du moyen qui me sert habituellement, moyen qui consiste à porter à l'ébullition le liquide à éprouver dans une cornue à col assez long, et à observer l'aspect des premières gouttelettes qui se condensent sur les parois froides, au moment où l'ébullition vient de commencer. S'il y a de l'alcool en petite quantité dans le liquide, ces gouttelettes se montrent sous la forme de larmes ayant une queue allongée ou sous la forme de gouttes petites ou plus grosses, très rondes, larmes et gouttes d'un aspect huileux. Si la cornue est jointe à un réfrigérant de Liebig, et que le caractère dont je parle ne se manifeste pas, on recommence la distillation sur les premières portions qui ont passé à la distillation; on répète ces distillations successives jusqu'à ce qu'on soit arrêté par l'insuffisance de la quantité de liquide de condensation. La plus faible proportion d'alcool peut être décelée par ces manipulations. Il est vrai que beaucoup de substances volatiles autres que l'alcool présentent dans les premiers produits de leur condensation le caractère indiqué; mais Bernard avait affaire à des liquides aqueux plus ou moins alcooliques.»

Pasteur fait remarquer en outre, que son procédé fut adopté par Bernard, et il ajoute que de simples vapeurs d'eau ne donnent jamais ces gouttes huileuses par condensation et que, lorsque les proportions d'alcool présentes sont très petites, il peut se produire quelque chose d'intermédiaire; au moyen d'une co-

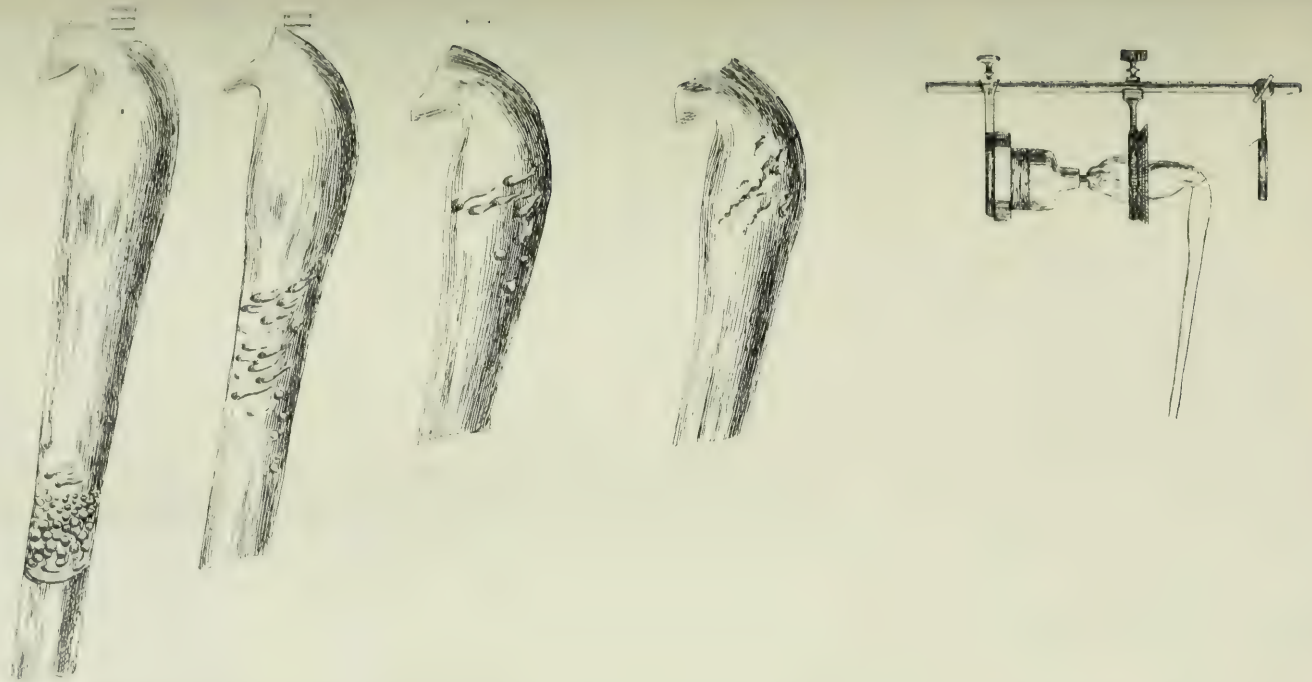


Fig. 1. La figure supérieure montre, à un grossissement de $^1/_{10}$, comment Pasteur exécutait la réaction à gouttes. La figure au-dessous montre les gouttes telles qu'elles se forment lorsque c'est de l'eau pure qui est condensée. I, II et III font voir divers stades de la condensation lorsqu'on est en présence d'alcool.

hobation du distillat on peut cependant alors, dit il, obtenir bien nette la réaction recherchée. Un dessin dont la figure 1 ci-contre est une reproduction, fait voir ce phénomène.

Comme nous l'avons dit, cette méthode est excellente, et elle mériterait d'être adoptée généralement. Telle qu'elle était exécutée autrefois au Laboratoire de Carlsberg, elle présentait toutefois certains inconvénients. En effet, le col de la cornue était refroidi à l'aide d'une éponge trempée dans de l'eau glacée, et c'est à l'endroit où l'éponge était pressée contre le col que les larmes caractéristiques apparaissaient. Or, il arrivait souvent que de petits glaçons adhérant à l'éponge tombaient sur le bain de sable porté à une forte chaleur ou sur la cornue, ce qui faisait éclater celle-ci. On tenta alors l'emploi d'une fiole Erlenmeyer muni d'un tube réfrigérant vertical, et, dès lors, l'inconvénient que nous venons de signaler disparut; mais en revanche, on rencontra des difficultés à observer les gouttes à travers l'eau du réfrigérant, et ce surtout lorsque la dose d'alcool présente était extrêmement minime. Au surplus, cette manière d'opérer ne permettait pas de faire des distillations répétées.

Il me vint alors à l'idée de modifier la méthode de manière à 1^0 n'avoir besoin que d'une très petite dose de liquide et 2^0 à éviter les distillations répétées et la réfrigération; la sensibilité en est en même temps augmentée au point de pouvoir immédiatement reconnaître la présence de 0,002 % d'alcool en volume, voire même parfois 0,001 % en volume.

Voici comment on procède:

5 cc. du liquide à examiner relativement à l'alcool qu'il pourrait contenir, sont versés dans une éprouvette de 180 mm. de longueur et 24 mm. de diamètre. On ferme l'éprouvette au moyen d'un bouchon en liège percé d'un trou[1]), au travers duquel passe un tube en verre ayant une longueur de 80 cm. et 3 mm. de diamètre extérieur. Le bout inférieur de ce tube traverse le bouchon sans le dépasser. L'éprouvette est fixée par une pince dans une position verticale immédiatement au-dessus d'une toile métallique. On chauffe alors l'éprouvette sur un bec de gaz pas trop grand placé sous la toile. La fig. 2 ci-contre montre le dispositif.

[1] Si l'on veut se servir du même bouchon pour plusieurs recherches, il faut naturellement, chaque fois qu'on s'en est servi, le nettoyer bien soigneusement en le faisant bouillir, puis sécher.

Le chauffage ne doit pas se faire brusquement, et il faut surtout éviter que le liquide ne fasse des soubresauts, ce à quoi on arrive en plaçant dans l'éprouvette une petite spirale en fil de cuivre mince. A noter aussi que le chauffage ne doit pas s'opérer trop lentement. Comme beaucoup de liqueurs nutritives écument fortement au cours du chauffage, il est recommandable d'ajouter trois gouttes d'acide nitrique fort, acide qui diminue en partie la formation d'écume[1]). Si la liqueur contient de l'alcool, on apercevra bientôt les gouttes huileuses caractéristiques dans le tube de verre, et ce à une hauteur qui dépendra de la quantité d'alcool présente: moins il y aura d'alcool, plus les gouttes se montreront haut dans le verre. Parfois — et surtout lorsque la liqueur vient à faire de forts soubresauts — il peut être utile de changer de tube (et de bouchon), si la réaction ne se manifeste pas dans le tube employé en premier lieu, ce qui indiquera qu'on est en présence de très peu d'alcool. Si l'on dispose d'une quantité suffisante de liquide, on pourra dans ce cas aussi effectuer d'abord une distillation pour rechercher ensuite l'alcool dans son produit. Une fois que l'on aura vu cette réaction se produire, on ne s'y trompera jamais.

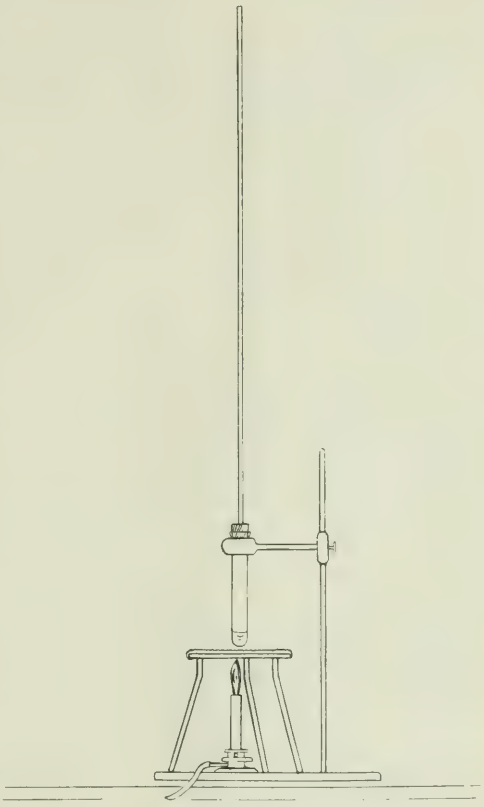


Fig. 2.

Dans le but de déterminer le degré de sensibilité de la ré-

[1]) Carl Pedersen, Dosage de petites quantités d'arsenic dans les matières organiques, spécialement dans la bière et dans le moût (Comptes-rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg **5**, 123 (1902)).

action, j'ai préparé des mélanges d'alcool avec les liqueurs nutritives communement utilisées, telles que le moût de bière, l'eau de levure, diverses solutions de sucre dans de l'eau de levure et dans de l'eau simple, l'eau pure, *etc.*, et les épreuves effectuées sur ces mélanges ont démontré (comme il a été dit plus haut) que l'on est à même de reconnaître avec certitude une proportion d'alcool aussi minime que 0,002 % en volume, quelquefois même 0,001 % en volume, — pourvu que le liquide ne jette pas trop d'écume, qui pénétrerait dans le tube, inconvénient qu'il faut toujours tâcher d'éviter.

Avant d'ensemencer de la levure, il importe beaucoup d'examiner toujours si le liquide destiné à servir de milieu nutritif renferme de l'alcool. En effet, j'ai remarqué que, abandonnés à eux-mêmes, des liquides nutritifs même stériles peuvent venir à contenir de l'alcool. Je vais mentionner plus en détail ce fait intéressant, en m'appuyant sur quelques observations que j'ai faites.

Un ballon Pasteur de 1 litre de capacité et renfermant du moût de bière, avait été laissé depuis six mois environ dans les magasins de notre laboratoire. Un examen de ce moût accusa une réaction bien nette prouvant la présence d'alcool. C'est alors qu'il me vint à l'idée que — comme dans le même local où se trouvent les armoires d'emmagasinage, il y a un séchoir dans lequel les objets en verre nettoyés sont mis pour sécher, et comme ces objets après avoir été passés à l'eau sont rincés avec de l'alcool et séchés ensuite par la chaleur du séchoir, — il se pouvait que l'alcool dont j'avais constaté la présence dans le moût provînt des vapeurs d'alcool qui se trouvent de temps à autre dans l'air ambiant.

Dans le but de me rendre compte si le moût est susceptible d'absorber de l'alcool provenant de l'air, j'entrepris alors l'essai que je vais relater. Du moût de bière bouilli qui à l'épreuve s'était montré absolument exempt d'alcool, fut mis en partie dans un gobelet (environ 150 cc.), en partie dans un ballon Pasteur de 1/8 l. (env. 90 cc.), et enfin une petite partie (10 cc.) dans un flacon Freudenreich. Le ballon Pasteur et le flacon Freudenreich furent bouchés de la manière habituelle, c'est-à-dire, le tube du capuchon de ce dernier, au moyen de coton, et le tube latéral du ballon Pasteur, à l'aide d'un petit tuyau en caoutchouc qui renfermait une petite baguette en verre; je laissai ouvert le tube

courbé de ce ballon et ne couvris pas le gobelet. Je plaçai le tout dans une caisse stérile Hansen[1]), dont le fond et les parois (mais non pas le plafond) furent humectés avec un mélange à environ 33 % d'alcool. Après 3 heures de repos, le moût fut soumis à un examen relatif à l'alcool, lequel eut pour résultat que le moût du gobelet accusait une réaction très nette et celui du flacon Freudenreich une réaction faible mais pourtant distincte, tandis que celui du ballon Pasteur ne donnait pas de réaction. Au bout de 3 jours, le moût du flacon Freudenreich manifestait une réaction très marquée, mais ce ne fut qu'au bout de 8 jours que le ballon Pasteur donna une réaction prononcée. Ces résultats montrent que le moût de bière peut absorber de l'alcool de l'air.

Des ballons contenant de l'eau de levure additionnée soit de dextrose, soit de maltose, et qui avaient séjourné plusieurs mois dans l'armoire ci-dessus mentionnée, se trouvèrent, eux aussi, renfermer de l'alcool.

En vue de vérifier si, laissées dans les armoires du laboratoire dans lesquelles sont conservées dans des flacons de nombreuses cultures dont la grande majorité contient de l'alcool, des liqueurs nutritives absorberaient de l'alcool, on plaça dans une de ces armoires un ballon Pasteur de 1 l. renfermant de l'eau de levure additionnée de dextrose. Au bout d'un mois environ, cette liqueur se montra contenir de l'alcool. Un ballon Pasteur de 1/8 l. contenant du moût de bière et placé au même endroit se trouva au bout de 4 mois être exempt d'alcool. De plus, je laissai séjourner dans la même armoire deux ballons Pasteur de 1/8 l. dont l'un était rempli de moût, et l'autre d'eau de levure additionnée de dextrose. Après un mois et demi de séjour, on put déceler dans l'eau de levure additionnée de dextrose une trace d'alcool, tandis que le moût en était absolument exempt. Deux mois plus tard, il en était de même.

Ainsi donc, on a pu constater, quant à la teneur en alcool, une différence entre le moût et l'eau de levure additionnée de dextrose. Cela étant, quel serait maintenant le résultat, si cette dernière liqueur était placée dans un endroit où il n'y aurait absolument pas de vapeurs d'alcool dans l'air? Afin de m'en

[1]) Voir Klöcker, Die Gärungsorganismen in der Theorie und Praxis der Alkoholgärungsgewerbe, 2. Aufl. 1906, p. 19, fig. 1.

rendre compte, je plaçai trois ballons Pasteur de $^1/_8$ l. dans une chambre dont l'air était exempt d'alcool. Dans l'un de ces ballons, je mis une solution aqueuse à 10 % de dextrose, dans le deuxième, une solution à 10 % de dextrose dans de l'eau de levure, et dans le troisième, de l'eau de levure non additionnée de dextrose. Dans l'un et l'autre cas, j'employai une même eau de levure. Avant de mettre les ballons à leur place, j'en soumis le contenu à une analyse minutieuse, qui démontra dans les trois cas l'absence absolue d'alcool dans les liqueurs. Après 14 jours, je procédai au premier examen, et l'eau de levure (sans dextrose) accusa un commencement de réaction d'alcool. C'était une réaction très faible et dont l'aspect différait quelque peu de la réaction typique, mais, quoi qu'il en soit, l'aspect des gouttes était bien différent de celui que présentent les gouttes auxquelles donne naissance le chauffage d'un liquide exempt d'alcool. Cela paraissait plutôt être la «chose intermédiaire» signalée par Pasteur. Il en était de même de l'eau de levure additionnée de dextrose; mais la solution aqueuse de dextrose ne donna pas de réaction. Au bout de deux mois environ, rien n'était changé, à ceci près que la réaction de l'eau de levure était alors devenue un peu plus nette. Après distillation de cette dernière, on y rechercha l'alcool d'après le procédé de Lieben. Il en résulta une odeur bien nette d'iodoforme, mais pas de cristaux.

Ainsi, il ne peut pas y avoir de doute que dans l'eau de levure laissée en repos, il ne puisse se former des proportions extrêmement faibles d'alcool, ce qui montre en outre, combien il faut être prudent et avoir toujours soin d'analyser la liqueur nutritive avant de s'en servir. Si l'analyse montre la présence d'alcool, il est alors indispensable de faire subir à la liqueur une ébullition assez prolongée afin de faire disparaître jusqu'à la dernière trace d'alcool.

Ainsi que nous l'avons mentionné plus haut, Pasteur signala en son temps que, en dehors de l'alcool, il est encore d'autres substances susceptibles de donner le caractère de larmes.

Lorsqu'il s'agit de déceler la présence d'alcool dans des liquides qui fermentent, il ne pourra guère être question d'autres corps que ceux dont l'apparition est due à une formation d'alcool qui l'aura précédée; c'est ce qui, par ex., est le cas pour tous les éthers. L'acétone, elle aussi, donne la réaction par gouttes, mais seulement lorsqu'elle est présente en assez forte proportion;

du reste, ce corps n'a jamais, que je sache, été mis en évidence comme résultat de l'action vitale de levures[1]. L'aldéhyde et la paraldéhyde ne donnent pas la réaction en question, et il en est de même des acides volatils tels que, par ex., l'acide acétique. Dans l'état actuel de nos connaissances sur ce sujet, il faut admettre que lorsqu'un liquide fermenté analysé d'après ma méthode donne le caractère de larmes de Pasteur, il y a eu une formation d'alcool au cours de la fermentation.

L'épreuve à l'iodoforme devra toujours être employée a titre de contrôle dans tous les cas où il peut y avoir des doutes. Dans ces cas-là, on peut remplacer l'éprouvette par une fiole Erlenmeyer, en substituant au tube droit un tube courbé en verre ayant la même longueur. Dans ce dernier, tout en recueillant le distillat, on observera en même temps le caractère de larmes.

Je vais relater quelques résultats obtenus par l'emploi de ce procédé.

En 1888, E. Chr. Hansen[2]) décrivit un champignon de levure auquel il donna le nom de Saccharomyces membranæfaciens, et que plus tard[3]) il rapporta à un genre particulier: Pichia. Ce qui principalement caractérisait cette espèce, c'était son impuissance à produire de l'alcool. Le fait d'avoir découvert une levure, un «ferment», incapable de provoquer la fermentation, fit à cette époque-là une sensation assez grande. Dans le but de rechercher la présence possible d'alcool dans les liqueurs nutritives sucrées ayant servi de milieu de culture, Hansen les examina en faisant usage de la méthode de Pasteur avec emploi de la cornue (voir plus haut): le caractère de larmes fit défaut. Ces essais furent répétés à plusieurs reprises.

Plus tard, P. Lindner[4]) a soutenu que l'espèce en question est capable de provoquer une faible fermentation dans les solutions de dextrose et de lévulose. Cette fermentation n'est pas visible a

[1]) D'après T. Takahashi et H. Sato (Journ. of the College of Agriculture. Imp. Univ. of Tokyo **1**, 233 (1911)), une variété du Willia anomala ensemencée dans un extrait de Koji aurait produit, entre autres, de l'acétone. Il me paraît cependant douteux qu'il en soit réellement ainsi.

[2]) Comptes-rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg, **2**, 147 (1888).

[3]) Centralbl. f. Bakt. u. Par., 2. Abt. **12**, 529 (1904), et Comptes-rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg, **9**. 48 (1911).

[4]) Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben.

l'œil nu: il est arrivé au resultat signalé à l'aide de la méthode dite «Kleingarmethode» introduite par lui. Celle-ci consiste à placer un petit cristal du sucre considéré dans le liquide se trouvant dans un verre objectif excavé, puis à y ajouter une dose de levure extrêmement minime. On pose dessus un couvre-objet, dont on fixe hermetiquement les bords au verre objectif avec de la vaseline. Si après un certain laps de temps, il apparaît des bulles d'air dans le liquide, Lindner estime qu'alors une fermentation a eu lieu. Nous avons répété dans notre laboratoire les essais faits par Lindner avec le Pichia membranæfaciens. mais sans pouvoir obtenir la formation de bulles. Aussi, cette «Kleingärmethode» a-t-elle été, de plusieurs côtés, l'objet de critiques, et — ainsi que H. Will et d'autres expérimentateurs l'ont démontré, — elle n'est certainement pas utilisable dans tous les cas. En outre, j'ai été amené a conclure que, pour obtenir des effets enzymatiques nettement constatables, il faut mettre en œuvre des quantités de sucre et de levure relativement considérables.

Comme nous l'avons vu, Lindner avait trouvé que le Pichia membranæfaciens était capable de faire fermenter des doses minimes de dextrose et de lévulose. J'essayai alors si, dans des cultures de la dite espèce faites dans de l'eau de levure additionnée de ces deux espèces de sucre, ma nouvelle méthode pouvait déceler de l'alcool et, en fait, je pus constater l'apparition d'un caractère de larmes très prononcé, réaction plus forte dans les cultures faites dans le lévulose. Il en fut de même pour celles qui eurent lieu dans du moût de bière. Le produit distillé donnait la réaction à l'iodoforme de Lieben. Il ne pouvait pas être question d'une formation d'acétone, parce qu'on n'en pouvait pas déceler dans le distillat; s'il y en avait, la proportion devait être inférieure à 0,003 %; or, d'après mon essai exposé plus haut, une dose si minime n'aurait pas pu donner la réaction par gouttes. La recherche de l'acétone fut faite suivant le procédé de Vorländer et Hobohm[1]).

Si Hansen n'a pas trouvé d'alcool dans les cultures de cette levure, cela tient en partie à ce qu'en employant la méthode telle qu'elle était usitée alors, il n'était pas en mesure de mettre en évidence des proportions d'alcool aussi faibles que

[1]) Ber. d. deutsch. chem. Ges. **29**, 1840 (1890).

celles dont il s'agit ici, — et cette mise en évidence est surtout impossible, si l'on ne procède pas à des distillations répétées —; mais son insuccès peut aussi provenir de ce fait que la fermentation ne se produit qu'avec une extrême lenteur[1]) et que la minime quantité d'alcool formée disparaît après un certain temps, parce que — de même probablement que tous les champignons formant des voiles — le Pichia membranæfaciens est doué du pouvoir d'oxyder l'alcool de manière à le convertir en acide acétique, puis en acide carbonique et en eau. Qu'il produit de l'acide acétique — bien que probablement en de faibles proportions —, je le constatai en faisant la distillation d'une culture en moût âgée de 6 à 7 semaines et qui n'accusait pas de réaction d'alcool. La saturation du distillat avec de la soude, puis l'évaporation jusqu'à la siccité, produisirent une odeur bien prononcée d'éther d'acide acétique lorsque je chauffai en présence de volumes égaux d'acide sulfurique et d'alcool. Tout liquide contenant de l'alcool constitue un excellent milieu nutritif pour tous les champignons à formation de voile, et j'en ai rencontré qui, bien que ne formant pas de voile, par ex. dans du moût de bière renfermé dans des flacons Freudenreich[2]), produisent pour ainsi dire instantanément un voile sec tout à fait typique quand on y ajoute quelques gouttes d'alcool. C'est là un phénomène important et dont il faudra tenir compte à l'avenir dans toute description systématique.

Ayant ainsi prouvé que le Pichia membranæfaciens est réellement en état de faire fermenter de petites quantités de dextrose et de lévulose, je fis des essais sur dix autres espèces non encore décrites et chez lesquelles on n'avait également pas pu constater la capacité de produire de l'alcool. Le résultat fut que

---

[1]) Ce n'est qu'au bout de 9 jours environ qu'on peut constater la présence d'alcool. Celui-ci ne peut pas provenir de l'eau de levure même, puisque des ballons témoins contenant de la même eau de levure non ensemencée ne donnèrent pas de réaction d'alcool; d'ailleurs, cette réaction-là est de beaucoup plus forte que celle que l'eau de levure peut donner et, en outre, elle se manifeste de beaucoup plus vite que celle se produisant avec de l'eau de levure. Au lieu d'eau de levure, j'ai essayé d'employer une liqueur nutritive artificielle; mais l'espèce en question ne s'y est pas développée.

[2]) A la vérité, en utilisant de fortes quantités de moût et des ballons présentant une très grande surface — par ex. des ballons Pasteur de 1 l. —, il peut se former un voile typique.

toutes donnèrent la réaction d'alcool, quelques-unes d'entre elles, il est vrai, seulement après une à deux semaines de repos.

Il convient de signaler à ce propos que la déclaration de Hansen d'après laquelle l'Oïdium lactis est à même de produire de légères doses d'alcool, s'est trouvée exacte, et qu'il en est de même d'une variété de Mycoderma cerevisiæ.

Dans le Tome V de ces Comptes-rendus (1900, p. 62), j'ai fait une description provisoire d'un Saccharomyces que j'avais isolé d'abeilles domestiques; je signalais, entre autres, qu'il peut provoquer la fermentation dans des solutions de dextrose, de lévulose et de maltose. Plus tard, j'ai dénommé cette espèce Zygosaccharomyces Priorianus[1]). P. Lindner dit[2]) qu'il a examiné cette espèce à l'aide de sa «Kleingärmethode» et qu'il doute qu'elle puisse faire fermenter le dextrose et le maltose. Il n'a donc pu arriver à un résultat bien déterminé. C'est pourquoi j'ai répété mes essais, qui ont démontré que mon indication antérieure était parfaitement exacte, car, ensemencée dans de l'eau de levure additionnée, soit de dextrose, soit de maltose, puis examinée d'après ma méthode, l'espèce en question donna une forte réaction d'alcool après un repos, respectivement, de 1 ou de 3 jours.

A. Harden et R. V. Norris ont tout récemment affirmé[3]) que le Saccharomyces Carlsbergensis Hansen (syn. Levure basse de Carlsberg N° 1) qui, d'après eux, n'est pas capable de faire fermenter le galactose, pourrait y être amené petit à petit en faisant des cultures répétées dans un liquide contenant ce sucre. Ceci n'est pas exact. Le Saccharomyces Carlsbergensis fait fermenter le galactose sans jamais avoir été cultivé précédemment dans un milieu renfermant ce sucre.

Après avoir ensemencé une culture pure de Saccharomyces Carlsbergensis dans de l'eau de levure additionnée de 5 % de galactose, je constatai que, au bout de vingt-quatre heures de repos à une température de 25°, il donnait la réaction d'alcool. Quoique le galactose employé eût été fourni par Kahlbaum et vendu comme étant pur, j'eus cependant l'idée qu'il pouvait

[1]) A. Klöcker, Die Gärungsorganismen in der Theorie und Praxis der Alkoholgärungsgewerbe, 2. Aufl. Stuttgart 1906, p. 265.

[2]) Wochenschrift für Brauerei, **28**, 64 (1911).

[3]) Proc. Royal Soc. London, Ser. B, **82**, 645 (résumé dans le «Chem. Centralbl.», 1910, p. 1490).

peut-être renfermer de petites doses d'autres sucres, par ex. de dextrose, prévision qui a été justifiée par le fait que le Saccharomyces apiculatus s'est trouvé produire de l'alcool dans une solution du sucre en question. C'est pourquoi, avant de m'en servir, je l'ai purifié en procédant comme suit: Ayant ensemencé le Saccharomyces Carlsbergensis dans de l'eau de levure additionnée de 5 % de galactose, je le mis au repos à 25°, où il resta jusqu'au lendemain. Après avoir décanté le liquide, je chassai l'alcool par ébullition pour stériliser ensuite à nouveau le liquide. Il était à présumer que, par suite de ce traitement, des traces possibles de dextrose avaient été éliminées, et, effectivement, il s'est trouvé qu'il en était bien ainsi, car le Saccharomyces apiculatus ne provoqua plus de fermentation dans le milieu ainsi préparé. J'ajoutai ensuite une nouvelle culture, engendrée en moût de bière, de Saccharomyces Carlsbergensis, laquelle, laissée en repos à 25° jusqu'au lendemain, fit accuser au liquide une forte réaction d'alcool. Enfin, je plaçai le Sacch. Carlsbergensis dans de l'eau de levure additionnée de 1 % de galactose: 5 jours après, il ne restait plus de sucre dans la liqueur, et celle-ci donnait une forte réaction d'alcool. Il ne peut donc pas y avoir de doute que le Sacch. Carlsbergensis (de même que probablement toutes les autres levures de brasserie à fermentation basse) ne soit capable de faire fermenter le galactose, fait qui, ainsi que je l'ai déjà signalé antérieurement[1]), confirme à son tour l'inexactitude de l'affirmation émise que, au moyen d'un mode déterminé de culture, on est à même de provoquer la formation d'une enzyme ne préexistant pas dans un microorganisme de fermentation. Les enzymes s'y trouvent toujours (bien qu'en quantité plus ou moins grande), et c'est cette quantité qu'il est peut-être possible d'augmenter par des procédés de culture déterminés. Au demeurant, ce que je viens de signaler est si évident, qu'il n'y a pas lieu d'insister là-dessus comme sur une chose remarquable.

Après que j'eus effectué les essais ci-dessus relatés, parut un mémoire intitulé: The Rate of Alcoholic Fermentation», par Arthur Slator[2]). Il y est dit que le «Sacch. Carlsberg» engendré dans du moût de bière houblonné ne donnait pas de fer-

[1] Comptes-rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg **5**, 58 (1900).

[2] Journ. of the Institute of Brewing, 1911, p. 147.

mentation apparente, même si la levure était laissée du jour au lendemain dans la solution de galactose. Si, par contre, la levure était engendrée dans un milieu contenant du galactose, cet auteur voyait se produire une fermentation rapide. Ainsi il arrive au même résultat que les deux chercheurs précédemment nommés. Slator ajoute: «Il faut donc admettre que le galactose est nécessaire pour produire l'enzyme capable de faire fermenter le galactose, enzyme qui existe dans la levure acclimatée, mais qui fait défaut dans celle qui s'est développée dans la solution dépourvue de galactose. Il est de toute évidence que l'acclimatation de la levure ne se remarquera pas, si cette dernière est ensemencée, par ex., dans de l'eau de levure additionnée de galactose pur; la liqueur ne tardera pas à manifester des indices d'une fermentation visible provoquée par les nouvelles cellules de levure bien vite formées, et il sera tout à fait impossible de dire si, oui ou non, c'est l'ensemencement qui a provoqué la fermentation.» Cela va de soi qu'il est impossible de déterminer si ce sont les cellules ensemencées elles-mêmes ou les bourgeons formés par elles qui font fermenter le galactose; mais s'il faut distinguer entre ces deux alternatives, toute discussion deviendra inutile. D'ailleurs, comme caractère systématique de l'espèce, cela n'a pas la moindre importance. Si cette théorie d'acclimatation est réellement exacte, il ne faudra pas une longue acclimatation pour produire une enzyme, si les bourgeons engendrés dans les vingt-quatre heures dans une solution de galactose sont déjà capables de faire fermenter ce sucre. D'ailleurs, j'ai aussi ensemencé une végétation de Saccharomyces Carlsbergensis engendrée dans du moût puis soigneusement lavée, dans une solution aqueuse de galactose préalablement purgée suivant le procédé décrit précédemment, à l'aide du Saccharomyces Carlsbergensis, du dextrose qu'elle pouvait contenir: le résultat fut qu'il s'y produisit une réaction d'alcool très forte et bien prononcée. Je m'étais, naturellement, bien assuré qu'il ne s'était pas produit de réaction d'alcool immédiatement après l'ensemencement. Quand, finalement, Slator dit que ses essais «confirm most conclusively the views of those who held the opinion that the yeast has to adapt itself to ferment galactose», il est, à mon avis, loin d'en être ainsi; ses essais ne sont pas plus concluants que ceux de ses prédécesseurs.

Pour terminer, j'ajouterai que, grâce à ma méthode, dont

j'ai plus d'une fois fait mention, j'ai réussi à démontrer que certaines formes de Saccharomyces apiculatus sont capables de faire fermenter de légères doses de maltose, étant donné que dans de l'eau de levure additionnée de ce sucre, solution au préalable débarrassée de dextrose, elles ont produit une réaction d'alcool bien marquée. Cette formation d'alcool avait lieu de la façon la plus intense et la plus rapide (après 5 jours environ) lorsque les cellules ensemencées avaient été engendrées dans de l'eau de levure additionnée de dextrose[1]).

Au cours des recherches exposées dans ce qui précède, M. V. Topp m'a prêté un précieux concours; aussi me fais-je un devoir de lui exprimer encore ici mes meilleurs remerciements.

[1]) Ce fait sera ultérieurement mis en lumière dans un mémoire traitant de la morphologie et de la physiologie de certaines formes de Saccharomyces apiculatus. Dans une note provisoire parue dans le «Centralbl. f. Bakt., Par. & Inf.», 2. Abt. **26**, 513 (1910), j'ai déjà signalé la découverte que j'ai faite, que quelques-unes de ces formes produisent de l'invertine.

Mai 1911.

ETUDES SUR LA SYNTHÈSE DES ACIDES AMINÉS.

IX. L'arginine racémique (acide α-amino-δ-guanido-n-valérique) et son isomère, α-guanido-δ-amino-n-valérique.

PAR

S. P. L. SØRENSEN, MARGRETHE HØYRUP ET A. C. ANDERSEN.

En 1877, M. Jaffé[1]) tira d'excréments de poules nourries avec de l'acide benzoïque un acide, $C_{19}H_{20}O_4N_2$, auquel il donna le nom d'*acide ornithurique* et qu'il montra devoir être considéré comme le dérivé dibenzoylé d'un acide diaminovalérique qu'il appela *ornithine*. Le travail de Jaffé prit un intérêt tout particulier après que, vers la fin du siècle dernier, E. Schulze et E. Winterstein[2]) eurent démontré que, chauffée en présence d'une solution d'hydroxyde de baryum, l'arginine, l'un des plus importants produits de décomposition des substances protéiques, est susceptible d'être scindée en urée et en ornithine de Jaffé, et que cette dernière, soumise à un traitement convenable au moyen de la cyanamide, peut redonner l'arginine.

Grâce à une série de travaux d'A. Ellinger[3]), E. Fischer[4]) et S. P. L. Sørensen[5]), la constitution de l'ornithine a maintenant été sûrement établie, et, d'autre part, la synthèse de la forme racémique de ce corps aussi bien que de ses deux formes optiquement actives a été réalisée. Ces travaux ont démontré que

[1]) Ber. d. d. chem. Ges., **10**, 1925 (1877), et **11**, 406 (1878).

[2]) Ber. d. d. chem. Ges., **30**, 2879 (1897); **32**, 3191 (1899), et Zeitschr. physiol. Chemie, **26**, 1 (1898); **34**, 128 (1901).

[3]) Ber. d. d. chem. Ges., **31**, 3183 (1898), et Zeitschr. physiol. Chemie, **29**, 334 (1900).

[4]) Ber. d. d. chem. Ges., **34**, 454 (1901).

[5]) Comptes-rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg, **6**, 30 (1902); **6**, 193 (1905), et Zeitschr. physiol. Chemie, **44**, 450 (1905).

l'ornithine a bien la formule proposée par Schulze et Winterstein, à savoir

$$NH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH,$$

en d'autres termes, qu'elle doit être considérée comme l'acide α-δ-diamino-n-valérique.

Etant donné que, d'après les expériences de Schulze et Winterstein citées ci-dessus, l'arginine peut être formée à partir de cet acide diaminovalérique par addition d'un groupe cyanamide, il s'ensuit que l'arginine doit être envisagée comme un acide α-δ-amino-guanido-n-valérique.

Toutefois, ainsi que A. Kossel[1]) l'a signalé le premier et que A. Küng[2]) l'a fait remarquer dernièrement, les recherches de Schulze et Winterstein ne donnent pas de réponse à la question de savoir auquel des deux groupes amine de l'ornithine la cyanamide est venue se joindre.

Si l'on assigne ordinairement à l'arginine la formule

$$NH_2 \cdot C(:NH) \cdot NH \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH,$$

cela tient à ce qu'un composé ayant un groupe guanidine dans la position α, aurait probablement, à l'instar de la créatine, une tendance à former, avec déshydratation, un noyau analogue à celui de la créatinine; or, cet anhydride de l'arginine n'est point connu. — Un autre argument en faveur de la formule précitée de l'arginine est fourni par les oxydations de l'arginine effectuées par Fr. Kutscher[3]) par le moyen du permanganate de baryum et qui l'ont conduit à l'acide guanido-butyrique et à l'acide succinique. Toutefois, ainsi que Albert Küng[4]) l'a signalé, la formation de ces produits de scission de l'arginine se laisse aussi expliquer — bien que d'une façon quelque peu forcée peut-être — en adoptant l'autre formule de l'arginine, ayant le groupe guanidine en position α.

La plus simple manière de résoudre cette question consiste évidemment à effectuer une synthèse indiscutable des deux acides α-δ-amino-guanido-n-valériques possibles, ou tout au moins de l'un d'eux. E. Fischer a tâché d'accomplir une telle synthèse

---

[1]) Ber. d. d. chem. Ges., **34**, 3218 (1901).

[2]) Zur Kenntniss der Homologen des Arginins, p. 20; Inaugural-Dissertation, Zürich 1909.

[3]) E. Bénech et Fr. Kutscher, Zeitschr. physiol. Chemie, **32**, 278 (1901).

[4]) A l'endroit cité, p. 23.

en traitant l'acide α-bromo-δ-phtalimido-n-valérique[1]) ou l'acide m-nitrobenzoyl-δ-amino-α-bromovalérique[2]) par la guanidine; mais le rendement obtenu a été si minime que la recherche n'a pas pu être menée à bout. De même, Albert Küng[3]) qui, faisant suite à la synthèse de l'ornithine réalisée par Fischer[4]), a cherché à préparer l'arginine par addition de la cyanamide à l'acide α-amino-δ phtalimido-n-valérique, n'a pas mieux réussi à obtenir le composé guanidé en α qui aurait dû être le résultat de cette opération.

Cette question de la synthèse de l'arginine a été également dans notre laboratoire l'objet de recherches approfondies. Dans un mémoire paru en 1905[5]) l'un de nous signalait que l'éther γ-bromopropyl-phtalimidomalonique, substance facilement accessible, peut, par traitement à la cyanamide de sodium, fournir un composé: l'éther γ-cyanamidopropyl-phtalimidomalonique

$$C_2H_5O\cdot CO)_2\,C{<}\begin{matrix}CH_2\cdot CH_2\cdot CH_2\cdot N:C:NH\\ N:(C_2O_2):C_6H_4\end{matrix}$$

qui, soumis à un traitement approprié avec l'ammoniaque ou des sels d'ammoniaque, pourrait peut-être fixer de l'ammoniaque, tout en convertissant le groupe cyanamide en un groupe guanidine. Une scission convenable du composé guanidique ainsi obtenu conduirait dès lors — ce que la formule fait voir immédiatement — à l'acide α-amino-δ-guanido-n-valérique, c'est-à-dire à l'arginine ou son isomère. Nous n'avons cependant pas réussi par cette voie à obtenir le corps aminoguanidinique cherché; ordinairement nous avons vu se former, comme produit final, des quantités abondantes de proline et, quelquefois, une proportion minime de guanidine.

En raison du groupement cyanamide présent, l'éther γ-cyanamidopropyl-phtalimidomalonique présente le caractère d'un acide monobasique et, traité à l'ammoniaque, fournit un éther amidé, qui apparaît également comme un acide monobasique, ayant probablement la formule

[1] Ber. d. d. chem. Ges., **34**, 457 (1901).

[2]) E. Fischer et G. Zemplén, Ber. d. d. chem. Ges., **43**, 935 et 2189 (1901); voir aussi H. Ramsay, *ibid.*, **41**, 4385 (1908), et **42**, 1137 (1909).

[3]) A l'endroit cité, p. 24.

[4]) Ber. d. d. chem. Ges., **34**, 454 (1901).

[5]) S. P. L. Sørensen, ces mêmes Comptes-rendus, **6**, 135 (1905); Zeitschr. physiol. Chemie, **44**, 453 (1905).

$$\begin{matrix} NH_2 \cdot CO \\ C_2H_5O \cdot CO \end{matrix} > C < \begin{matrix} CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot N : C : NH \\ N : (C_2O_2) : C_6H_4 \end{matrix}.$$

En traitant l'éther amidé par une solution d'hydroxyde de baryum, on arrive au sel barytique de l'acide bibasique:

$$\begin{matrix} NH_2 \cdot CO \\ HO \cdot CO \end{matrix} > C < \begin{matrix} CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot N : C : NH \\ N : (C_2O_2) : C_6H_4 \end{matrix},$$

tandis que l'éther γ-cyanamidopropyl-phtalimidomalonique donne, en présence de l'hydroxyde de baryum, le sel barytique de l'acide tribasique γ-cyanamidopropyl-phtalimidomalonique:

$$(HO \cdot CO)_2 C < \begin{matrix} CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot N : C : NH \\ N : (C_2O_2) : C_6H_4 \end{matrix}$$

qui, étant un acide malonique substitué, cède facilement de l'acide carbonique. De même, en traitant ces produits moins complexes par l'ammoniaque ou des sels d'ammoniaque, nous n'avons pas non plus réussi à obtenir l'acide α-amino-δ-guanido-n-valérique. Dans la partie expérimentale du présent mémoire, B, on trouvera une description détaillée de ces composés; cette partie de nos recherches est due à **M. A. C. Andersen.**

Toutefois, ainsi qu'il ressort d'une communication préliminaire publiée l'année dernière[1]), nous sommes parvenus par une autre voie à réaliser la synthèse de ces deux acides α-δ-amino-guanido-valériques.

Comme suite à des recherches antérieures[2]) sur quelques dérivés benzoyles d'acides oxyamino-monocarboniques, nous avons tenu à examiner la manière dont se comporte l'acide ornithurique chauffé en présence d'acide chlorhydrique ou d'alcalis. Nous sommes arrivés à ce résultat que, traité à l'acide chlorhydrique concentré chaud, l'acide ornithurique fournit l'ornithine monobenzoylée en δ pure:

$$C_6H_5CO \cdot NH \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH$$

tandis que bouilli en présence d'une solution norm. au $^1/_5$ d'hydroxyde de baryum, il donne l'ornithine monobenzoylée en α pure:

$$NH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH(NH \cdot COC_6H_5) \cdot COOH.$$

Pourvu que l'on choisisse des conditions expérimentales convenables, le rendement de ces deux produits sera très satisfaisant, comme on pourra le voir dans la partie expérimentale.

[1]) S. P. L. Sørensen et M. Høyrup, Ber. d. d. chem. Ges., **43**, 645 (1910).
[2]) S. P. L. Sørensen et A. C. Andersen, Comptes-rendus des travaux du Labor. de Carlsb., **7**, 113 (1908), et Zeitschr. physiol. Chemie, **56**, 249 (1908).

La place du groupe aminé et, par conséquent, aussi celle du groupe monobenzoylé dans les deux ornithines monobenzoylées isomères, fut déterminée par désamination, opération qui eut pour résultat que le groupe amine libre fut remplacé par un groupe hydroxyle. Nous pûmes constater en même temps que la monobenzoylornithine résultant du traitement de l'acide ornithurique par les alcalis, donnait par désamination un acide oxymonobenzoylamino-n-valérique, qui se trouva être identique à l'acide *α*-benzoylamino-*δ*-oxy-n-valérique déjà connu[1]):

$$OH \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH\,(NH \cdot CO \cdot C_6H_5) \cdot COOH.$$

Le groupe benzoyle de cette ornithine monobenzoylée doit donc entrer dans le groupe amine en *α* et, conséquemment, nous la désignerons comme *α*-monobenzoyl-ornithine.

Par contre, la monobenzoyl-ornithine obtenue en traitant l'acide ornithurique par l'acide chlorhydrique, donna par désamination un oxyacide monobenzoyl-aminé doué de propriétés tout autres que celles de l'oxyacide précédent. En effet, alors que l'acide *α*-benzoylamino-*δ*-oxy-n-valérique est difficilement soluble dans l'eau et fournit un sel de baryum facilement soluble aussi bien dans l'eau que dans l'alcool, c'est le contraire qui se produit pour l'autre oxyacide benzoylamino-n-valérique: cet acide même se dissout facilement dans l'eau, tandis que le sel barytique est difficilement soluble dans l'eau et très difficilement dans l'alcool. Il s'ensuit que l'ornithine monobenzoylée obtenue par traitement à l'acide chlorhydrique doit être représentée par la seconde des deux formules possibles, c'est-à-dire que son groupe benzoyle entrera dans la position *δ*.

En parfait accord avec ce résultat, cette monobenzoylornithine résultant du traitement par l'acide chlorhydrique présentait tout à fait le même aspect et les mêmes propriétés que l'ornithine *δ*-monobenzoylée préparée récemment par E. Fischer et G. Zemplén[2]) au moyen d'une synthèse indiscutable. De même — ainsi que ce résultat devait le faire présumer —, l'acide oxyaminé libre de benzoyle obtenu par désamination de l'ornithine *δ*-monobenzoylée, présentait des propriétés identiques à celles de l'acide *α*-oxy-*δ*-amino-n-valérique:

---

[1]) S. P. L. Sørensen et A. C. Andersen, ces mêmes Comptes-rendus, **7**, 114 (1908), et Zeitschr. physiol. Chemie, **56**, 291 (1908).

[2]) Ber. d. d. chem. Ges., **42**, 1025 (1909).

$$NH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH(OH) \cdot COOH,$$

que E. Fischer et G. Zemplen[1]) ont obtenu par une autre voie.

En partant des deux monobenzoylornithines isomères, nous avons, par addition de cyanamide, préparé les deux acides guanido-monobenzoylamino-n-valériques, qui après séparation du groupe benzoyle nous ont fourni les deux acides α-δ-amino-guanido-n-valériques. Nous fûmes alors à même de constater, d'un côté, que le composé guanidique résultant de l'addition de cyanamide à l'ornithine α-monobenzoylée et auquel il faut assigner la formule que voici:

$$NH_2 \cdot C(:NH) \cdot NH \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH(NH \cdot CO \cdot C_6H_5) \cdot COOH$$

et, d'autre part, les composés libres de benzoyle auxquels il donna naissance, se comportent de tout point comme les dérivés d'arginine correspondants. Pour faire la comparaison nous nous servîmes d'une préparation d'arginine tirée par M. H. Jessen-Hansen d'édestine provenant de chènevis, puis racémisée d'après le procédé d'O. Riesser[2]).

Par contre, le composé guanidique obtenu par addition de cyanamide à l'ornithine δ-monobenzoylée ainsi que les produits libres de benzoyle préparés à partir de cette ornithine, étaient doués de propriétés toutes différentes; nous devons particulièrement signaler que l'acide α-guanido-δ-amino-n-valérique

$$NH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH(NH \cdot C(:NH) \cdot NH_2) \cdot COOH$$

se déshytratait facilement d'une manière identique à celle dont la créatine se convertit en créatinine[3]).

Ainsi qu'on le verra dans la partie expérimentale (A), le rendement obtenu dans la préparation des composés ci-dessus mentionnés a bien été assez satisfaisant, mais il a été loin d'être quantitatif: de

l'α-monobenzoylornithine

nous avons tiré par désamination 57 à 63 % de la quantité calculée d'oxyacide, et par addition de cyanamide 62 à 63 % de la quantité calculée de composé guanidique, et la désamination de

la δ-monobenzoylornithine

nous a fourni 57 à 63 % de la quantité théorique d'oxyacide,

---

[1]) Ber. d. d. chem. Ges., **42**, 4878 (1909).

[2]) Zeitschr. physiol. Chemie, **49**, 222 (1906).

[3]) Comp. aussi Emil Gansser, Die nächsten Homologen des «Sarkosins» und des «Kreatins» (Zeitschr. physiol. Chemie, **61**, 16 (1909)).

tandis que l'addition de cyanamide n'a donné que 50 à 55 % de la quantité théorique de corps guanidique.

Vu que le rendement s'est ainsi élevé, dans tous les cas, à plus de la moitié de la valeur calculée, nous pouvons en toute sûreté conclure de ces essais que dans l'*α*-monobenzoylornithine aussi bien que dans l'oxyacide benzoylaminé et le composé guanidique obtenus à partir d'elle, le groupe benzoylaminé se trouve dans la même position, — vu aussi que dans l'oxyacide benzoylaminé préparé par une autre voie le groupe benzoylamine est en position *α* (v. p. 126), il doit en être de même pour les deux autres composés. Par conséquent, nous croyons pouvoir affirmer qu'il a été établi d'une façon irréfutable que dans le composé guanidique obtenu à partir de l'*α*-monobenzoylornithine, par addition de cyanamide, ainsi que dans les produits exempts de benzoyle auxquels ledit composé a donné naissance, le groupe guanidine se trouve en position *δ*.

Ainsi, la synthèse de l'arginine a été réalisée d'une manière complète et qui ne laisse plus de doute sur la formule qu'il faut lui assigner.

De plus, si l'on prend en considération que, d'un côté, desaminée au moyen de la nitrite de baryum, l'*α*-monobenzoylornithine n'a guère fourni de quantité appréciable du sel barytique difficilement soluble de l'acide *α*-oxy-*δ*-benzoylamino-n-valérique (v. p. 126) et, d'autre part, que par addition de cyanamide la *δ*-monobenzoylornithine n'a pas donné la moindre trace de l'acide *α*-benzoylamino-*δ*-guanido-n-valérique également peu soluble (v. p. 148), nous nous croyons autorisés à en conclure que les deux monobenzoylornithines, loin d'être des mélanges des deux isomères, ont toutes deux été pures ou à peu de chose près.

Il ne nous reste plus qu'à attirer l'attention sur un seul point. Aux conclusions que nous avons tirées des résultats précédemment exposés on pourrait peut-être objecter qu'il pouvait bien avoir été possible que l'addition de cyanamide n'ait point eu lieu au groupe amine primaire libre, mais au groupe benzoylamine secondaire. Il est vrai qu'un tel processus peut s'imaginer, mais il n'est guère probable qu'il ait pu se réaliser. En outre, nous avons pu mettre en évidence que l'addition a bien réellement eu lieu au groupe amine primaire; nous y sommes arrivés en utilisant le fait connu qu'un groupe amine et un groupe

guanidique se comportent différemment vis-a-vis du formol, en ce sens que l'addition de celui-ci ne fait pas changer le caractère basique du groupe guanidique, alors que le groupe amine se trouve neutralisé[1]). Or, nous avons constaté que, additionnées de formol, les deux monobenzoylornithines pouvaient être titrées bien nettement comme des acides monobasiques, tandis que l'addition du même réactif, soit aux composés guanidiques formés par synthèse, soit à un échantillon de monobenzoylarginine préparée à partir de l'arginine racémisée, ne provoquait point de modification du titre d'acidité. Par conséquent, ces derniers produits doivent renfermer un groupe benzoylamine, mais pas de groupe amine libre.

Enfin, il faut remarquer que non seulement l'α-monobenzoylornithine, mais aussi les autres composés mentionnés dans ce mémoire et contenant un groupe amine primaire en position δ, se laissent très nettement titrer au formol. Ainsi qu'il était a prévoir, la totalité de l'azote de l'acide α-oxy-δ-amino-n-valérique est titrable au formol, tandis que pour l'anhydride de l'acide α-guanido-δ-amino-n-valérique un quart seulement peut être titré ainsi. Comme on pouvait également s'y attendre, l'oxy-pipéridone qui prend naissance à la suite d'une déshydratation partielle de l'acide oxy-amino-n-valérique, avec fermeture de la chaine, est un corps *neutre*, et l'addition de formol n'y change rien.

PARTIE EXPÉRIMENTALE.

A. Les deux ornithines monobenzoylées et leurs dérivés oxy- et guanidiques.

1. α-monobenzoylornithine.

$NH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH(NH \cdot CO \cdot C_6H_5) \cdot COOH$.

0,1 molécule-gramme (34 gr.) d'acide ornithurique fut chauffé au bain-marie pendant 10 heures dans un ballon en cuivre argenté[2]) contenant 1100 cc. d'une solution 0,4-n. d'hydroxyde de baryum et 600 cc. d'eau. Après refroidissement à la glace, on fit précipiter la solution au moyen de 110 cc. d'acide chlorhydrique

[1]) S. P. L. Sørensen, ces mêmes Comptes-rendus **7**, 16 (1907); Biochem. Zeitschr., **7**, 60 (1907).

[2]) Lorsqu'on se servait d'un ballon en verre pour le chauffage, il se trouvait difficile d'obtenir une ornithine monobenzoylée exempte de cendre.

5-n., ce qui donna, d'un côté, un filtratum (F_1) renfermant en tout 1706 mgr. d'azote et, de l'autre, un précipité, qu'on chauffa à nouveau pendant 10 heures, en présence d'un mélange de 550 cc. de la solution barytique 0,4-n. et de 300 cc. d'eau. En faisant précipiter cette solution au moyen de 55 cc. d'acide chlorhydrique, on obtint, avec un filtratum (F_2) contenant en tout 568 mgr. d'azote, un précipité qui, soumis au traitement ci-dessus indiqué, fournit un filtratum (F_3) dont la teneur en azote etait de 290 mgr., et un précipité qui, débarrassé de l'acide chlorhydrique par des lavages et puis bouilli avec de l'eau, laissa indissous $2^{gr},7$ d'acide ornithurique.

Les trois liqueurs F_1, F_2 et F_3 furent réunies, et on en élimina l'acide benzoïque à l'aide de l'éther, pour neutraliser ensuite la solution exempte d'acide benzoïque au moyen d'une solution barytique. Après addition d'une dose d'acide chlorhydrique légèrement supérieure à la moitié de la quantité équivalente à l'azote présent, on fit évaporer dans le vide jusqu'à obtention d'une bouillie, qu'on épuisa à l'alcool absolu, ce qui laissa indissoute la plus grande partie du chlorure de baryum, tandis que le chlorhydrate de l'ornithine monobenzoylée entra en dissolution alcoolique[1]). Après addition d'eau, puis évaporation de l'alcool, on neutralisa à nouveau la liqueur au moyen d'hydroxyde de baryum, pour précipiter ensuite la totalité du chlorure barytique au moyen de sulfate d'argent.

La solution ainsi obtenue fut évaporée dans le vide jusqu'à consistance d'une bouillie. Un chauffage au bain-marie fournit alors une solution limpide presque incolore, dont on sépara par filtration quelques flocons et qu'on abandonna ensuite à elle-même pour que la cristallisation pût se faire. Celle-ci ne s'opéra que lentement; toutefois, au bout de quelques jours de repos dans la glacière, il s'était formé un dépôt abondant qui, après filtration, lavage avec un peu d'eau et dessiccation à l'air. pesait $7^{gr},0$; en soumettant l'eau-mère à une évaporation ultérieure, on en tira $5^{gr},1 + 2^{gr},7$. La dernière eau-mère renfermait 614 mgr. d'azote, probablement en partie sous forme d'ornithine. Réunie avec trois autres solutions du même genre, elle fut benzoylée pour récupérer l'acide ornithurique.

[1]) Il faut bien se garder de faire évaporer jusqu'à siccité complète parce qu'alors le chlorure barytique ne se laisserait pas débarrasser de son azote par des lavages à l'alcool.

Quatre opérations semblables dans lesquelles on employait chaque fois 0,1 molécule-gramme d'acide ornithurique, fournirent en tout:

56gr,65 d'ornithine α-monobenzoylée (60 % de la quantité calculée).

Par benzoylation de la dernière eau-mère (voir ci-dessus) on récupéra 17gr,3 d'acide ornithurique, et l'ébullition du mélange d'acide benzoïque et d'acide ornithurique obtenu après le troisième traitement par de l'eau de baryte, rendit 11 gr. d'acide ornithurique, en tout 28gr,3, c'est-à-dire un peu plus de 20 % de la matière initiale.

On fit recristalliser la monobenzoylornithine en en dissolvant la totalité (56gr,6) dans env. 700 cc. d'eau bouillante, puis filtrant et abandonnant la solution à la température du laboratoire. On vit bientôt la monobenzoylornithine former un dépôt qui, examiné au microscope, présentait des cristaux allongés, dont la majorité rappelait l'aspect d'un poivrier, quelques-uns avaient la forme d'aiguilles aplaties et un très petit nombre étaient nettement rectangulaires. Après trois jours de repos, on essora à la trompe, et le précipité fut passé quelques fois à l'eau froide; nous désignerons le produit ainsi obtenu par α-monobenzoylornithine A. Le rendement en était de 28gr,3. En faisant évaporer l'eau-mère et l'eau de lavage, on en tira l'α-monobenzoylornithine B: 19gr,2, et C: 4gr,4, tous deux étant d'un aspect tout à fait pareil à celui de A. Desséchées dans le vide sur l'acide sulfurique, les substances séchées à l'air perdirent environ 0,5 %.

0gr,1466 de la substance A, analysé d'après Kjeldahl, donnait une quantité d'ammoniaque correspondant à 17mgr,34 d'azote (11,83 %).

0gr,1141 de la substance B, analysé par le même procédé, donnait une quantité d'ammoniaque correspondant à 13mgr,44 d'azote (11,87 %).

0gr,1706 de la substance A donnait par combustion 0gr,1046 d'eau (6,86 % d'hydrogène) et 0gr,3806 d'acide carbonique (60,84 % de carbone).

		Calculé	Trouvé	
			A	B
C_{12}	144,00	60,98	60,84	
H_{16}	16,13	6,83	6,86	
N_2	28,02	11,87	11,83	11,78
O_3	48,00	20,32		
	236,15	100,00		

L'ornithine α-monobenzoylée fond à 264—267° (Bloc Maquenne, 5 secondes). Ce composé est difficilement soluble dans l'eau froide et un peu plus soluble dans l'eau bouillante; pourtant il se dissout bien plus facilement dans l'eau même froide que le dérivé benzoylé en δ (voir p. 139), et il ne possède point cette disposition marquée à la cristallisation qui caractérise ce dernier. De même que celui-ci, il est insoluble ou tout au moins très difficilement soluble dans l'alcool et l'éther.

La solution aqueuse accusait une réaction neutre; additionné de formol le composé se laissait titrer nettement comme un acide monobasique.

0^{gr},3675 d'ornithine monobenzoylée en α titrée au formol, demandait 7^{cc},78 de solution au $^1/_5$ d'hydroxyde de sodium (calculé 7^{cc},78).

2. Désamination de l'α-monobenzoylornithine.

On mélangea ensemble dans un ballon de 1,5 l. de capacité 0,05 molécule-gramme d'α-monobenzoylornithine (11^{gr}.8 de la substance A, p. 123) + 12 gr. de nitrite de baryum + 120 cc. d'eau. Une partie seulement de la matière est entrée immédiatement en dissolution; mais au cours de la désamination, on a vu se dissoudre une partie de plus en plus grande, et à la fin de la réaction la solution était devenue parfaitement limpide.

Dans le but de prévenir autant que possible toute réaction accessoire[1]), on a opéré la désamination en milieu très faiblement acide et à la température ordinaire, tout en maintenant à l'aide d'une pompe à l'huile un vide presque absolu dans le ballon. Au début, le dégagement de gaz se faisait assez vivement, et la réaction de la solution ne tarda pas à devenir neutre ou faiblement alcaline; au bout de deux heures environ on y ajouta alors, avec précaution et en agitant bien, 5 cc. d'acide chlorhydrique 0,2-n., ce qui eut pour effet de rendre à nouveau la réaction légèrement acide et d'augmenter encore le dégagement d'azote. Vers la fin de l'opération, le changement de réaction fut plus lent à se produire, et finalement la solution demeurait acide même si on l'abandonnait à elle-même pendant 8 heures, fait que nous considérâmes comme un indice que la

[1]) Voir p. ex. M. Freund et F. Schönfeldt, Ber. d. d. chem. Ges., **24**, 3350 (1891).

désamination était terminée. Au cours de l'opération on avait ajouté à la solution, en tout, 20 × 5 cc. d'acide chlorhydrique 0,2-n.

Afin d'éliminer l'excès de nitrite, on ajouta 10 gr., et plus tard encore 2 gr. de chlorure d'ammonium, après quoi on évacua pendant 4 jours, en ajoutant chaque jour 5 cc. d'acide chlorhydrique 0,2-n. Ensuite la liqueur fut rendue alcaline au moyen d'une lessive de baryte, et l'ammoniaque fut chassée dans le vide. La solution nettement alcaline même après la distillation, fut neutralisée par l'acide chlorhydrique et se trouva alors contenir 704 mgr. d'azote[1]); étant donné que, après la désamination, la teneur en azote calculée doit être de 700 mgr., on voit que le processus a donné un rendement quantitatif.

Afin de séparer le chlorure de baryum d'avec le sel barytique de l'acide *α*-benzoyl-*δ*-oxy-n-valérique formé par la désamination, nous avons tiré profit de ce fait déjà connu[2]) que ce dernier est facilement soluble dans l'alcool absolu. Comme le sel barytique de l'acide *α*-oxy-*δ*-benzoylamino-n-valérique est insoluble dans l'alcool (v. p. 140), nous pouvions par ce traitement à l'alcool nous rendre compte également si une partie de ce dernier corps avait été formée lors de la désamination ou, en d'autres termes, si l'ornithine *α*-monobenzoylée ayant servi de matière première avait renfermé de l'ornithine monobenzoylée en *δ*. C'est pourquoi nous avons évaporé la solution neutre dans le vide jusqu'à consistance d'une bouillie et que nous avons traité celle-ci à l'alcool absolu. Le résidu que laissa ce traitement était constitué par le chlorure de baryum, qui a été reconnu être dépourvu d'azote. Après avoir évaporé de nouveau presque jusqu'à siccité la solution alcoolique que nous avions obtenue, nous avons épuisé à l'alcool en réfrigérant à la glace le nouveau résidu. Le chlorure de baryum résiduel contenait alors, en tout, 2 mgr. d'azote. La solution alcoolique évaporée complètement dans le vide laissa une huile jaunâtre qui, abandonnée au repos, s'est solidifiée en partie. Après traitement de cette matière à l'alcool absolu réfri-

[1]) Le dosage de l'azote a été effectué d'après le procédé Kjeldahl; seulement, eu égard à une teneur éventuelle de nitrite, on évapora préalablement l'échantillon à plusieurs reprises au bain-marie en présence d'acide sulfurique étendu.

[2]) Ces mêmes Comptes-rendus, **7**, 125 (1908); Zeitschr. physiol. Chemie, **56**, 292 (1908).

géré à la glace, il n'en resta qu'une petite partie à l'état indissous, laquelle fut séparée par filtration. Le dosage de l'azote dans le filtre avec son contenu a donné, en tout, $6^{mgr},7$ d'azote. Peut-être cette teneur en azote n'est-elle due qu'à un lavage imparfait; peut-être aussi indique-t-elle la présence d'une faible quantité du sel barytique difficilement soluble mentionné plus haut; quoi qu'il en soit, la dose dont il s'agit est si minime qu'il nous semble justifié de conclure de cet essai que la matière première n'a contenu, tout au plus, que des proportions extrêmement peu considérables de δ-monobenzoylornithine.

En vue d'identifier l'oxyacide auquel la désamination avait donné naissance, nous avons isolé aussi bien l'acide α-benzoylamino-δ-oxy-n-valérique que le sel cuivrique de l'acide α-amino-δ-oxy-n-valérique, en traitant comme suit la solution alcoolique mentionnée plus haut du sel barytique.

Après addition d'eau, on a chassé l'alcool dans le vide, puis précipité la solution assez concentrée au moyen de 15 cc. d'acide chlorhydrique 5-n. Ayant obtenu un précipité huileux qui abandonné à lui-même jusqu'au lendemain n'a pas cristallisé, on l'a fait dissoudre en l'additionnant d'eau, puis chauffant légèrement. En faisant évaporer ensuite la solution dans le vide à basse température, on a bientôt vu se séparer des cristaux baignés d'une huile, qui cependant, laissée à elle-même, s'est solidifiée entièrement du jour au lendemain.

Le dépôt séparé par filtration, puis lavé et séché à l'air, pesait $7^{gr},9$, c'est-à-dire 66,6 % de la quantité calculée.

Le produit brut, qui présentait une teinte légèrement jaune et qui d'ailleurs avait un bel aspect et notamment tout à fait cristallin, fut recristallisé dans 125 cc. d'eau chaude. Un peu d'huile s'étant séparé par réfrigération, fut dissous par addition d'alcool et, après avoir amorcé la solution avec un cristal retenu, puis agité à plusieurs reprises, on a vu l'acide cristalliser promptement et facilement du jour au lendemain. Sur le produit une fois recristallisé (A) et qui desséché à l'air pesait $4^{gr},9$, on préleva 1 gr. pour l'analyser. Le reste fut recristallisé encore une fois dans de l'eau, et l'acide α-benzoylamino-δ-oxy-n-valérique se sépara sous forme d'un beau précipité blanc et cristallin qui, examiné au microscope, montrait des cristaux courts et épais, à pans nombreux, identiques à ceux décrits dans un

mémoire antérieur[1]). Le rendement du produit recristallisé deux fois (B), puis séché à l'air, s'élevait à $3^{gr},35$.

Desséché dans le vide sur de l'acide sulfurique, le produit A perdait 0,5 % de son poids; B: 2,2 %.

$0^{gr},1864$ du produit A donnait, d'après Kjeldahl, une proportion d'ammoniaque correspondant à $10^{mgr},90$ d'azote (5,85 %).

De même $0^{gr},3152$ de la matière séchée B donnait une quantité d'ammoniaque répondant à $18^{mgr},42$ d'azote (5,84 %).

$0^{gr},1639$ du produit séché B donnait par combustion $0^{gr},0961$ d'eau (6,56 % d'hydrogène) et $0^{gr},3651$ d'acide carbonique (60,75 % de carbone).

		Calculé	Trouvé	
			A	B
C_{12}	144,00	60,73		60,75
H_{15}	15,12	6,38		6,56
N	14,01	5,91	5,85	5,84
O_4	64,00	26,98		
	237,13	100,00		

Le produit A fondait au bloc Maquenne en 5 sec. à 157°, B à 160°. Un acide α-benzoylamino-δ-oxy-n-valérique préparé antérieurement par une autre voie[2]) fondait, même après des recristallisations répétées, également à 160°.

L'eau-mère et les eaux de lavage de la cristallisation du produit brut ainsi que des solutions correspondantes obtenues par les recristallisations de l'acide α-benzoylamino-δ-oxy-n-valérique, furent mélangées pour servir à la préparation du sel cuivrique de l'oxyacide aminé exempt de benzoyle. Après évaporation jusqu'à un petit volume, on enleva l'acide benzoïque par ébullition en présence d'acide chlorhydrique concentré, puis élimina l'acide benzoïque, l'acide chlorhydrique et le chlorure de baryum à la manière habituelle, ce dernier par précipitation au moyen du sulfate d'argent. La solution obtenue fut bouillie avec du carbonate de cuivre, puis filtrée et évaporée jusqu'à commencement de cristallisation. Après réfrigération on aperçut une abondante formation d'un dépôt cristallin apparemment lamellé, d'une couleur bleu violet à éclat soyeux[3]), dont la quantité s'accrût lorsqu'on

---

[1]) Ces mêmes Comptes-rendus, **7**, 124 (1908); Zeitschr. physiol. Chemie, **56**, 291 1908.

[2]) *loc. cit.* Dans le mémoire cité, le point de fusion a été donné, par erreur, comme étant d'env. 170°, au lieu de 160° env.

[3]) Comp. ces mêmes Comptes-rendus, **6**, 160 (1905).

ajouta au liquide, par petites portions, le double de son volume d'alcool. Après repos jusqu'au lendemain, on filtra à la trompe, puis lava le dépôt avec de l'alcool de plus en plus fort. Rendement en sel cuivrique A: 1gr,58. Évaporée, puis précipitée par l'alcool, l'eau-mère fournit 0gr,66 de sel cuivrique B. L'eau-mère provenant de la cristallisation de B avait conservé une forte coloration.

Desséché dans le vide sulfurique, le sel cuivrique A perdit 1,7 %. B: 5 %.

0gr,1701 de sel cuivrique A séché accusait d'après Kjeldahl une teneur en ammoniaque correspondant à 14mgr,38 (8,54 %).

0gr,2128 de sel cuivrique séché B donnait, par le même procédé, une proportion d'ammoniaque correspondant à 18mgr,01 d'azote (8,46 %).

0gr,2373 de sel cuivrique séché B donnait 0gr,0578 d'oxyde de cuivre (19,46 % de cuivre).

Calculé: 8,55 % d'azote et 19,40 % de cuivre.

Ainsi, dans l'expérience de désamination que nous venons de relater, nous avons obtenu les quantités suivantes de produits séchés et suffisamment purs pour être analysés:

4gr,27 d'acide α-benzoylamino-δ-oxy-n-valérique . 36 % de la théorie.
2gr,18 du sel cuivrique de l'acide α-amino-δ-oxy-n-valérique . . . . . 26,5 % —

En tout: 62,5 % de la théorie.

Pour être complets nous devons encore ajouter que, à l'eau-mère provenant de la cristallisation du sel B ainsi qu'aux restes des sels analysés, nous avons enlevé le cuivre au moyen de l'hydrogène sulfuré en milieu chlorhydrique, puis, après évaporation jusqu'à siccité, nous avons chauffé le résidu en présence d'acide chlorhydrique concentré pendant 8 heures au bain d'huile à une température allant de 140° à 150°. Comme à la suite d'un tel chauffage l'acide α-amino-δ-oxy-n-valérique se change partiellement en α-proline[1]), il s'ensuit que dans le cas considéré il fallait aussi s'attendre à arriver à une formation de proline. A cet effet, après évaporation de la solution au bain-marie, puis élimination de l'acide chlorhydrique au moyen du carbonate d'argent, la solution, qui ne devait dès lors renfermer que de la proline et de l'acide oxyaminé non transformé, fut évaporée jusqu'à siccité, après quoi la proline, s'il y en avait, fut extrait à l'alcool.

[1]) Voir ces mêmes Comptes-rendus, **6**, 168 (1905).

On chassa alors l'alcool de la solution alcoolique, précipita la proline sous forme de phosphotungstate, et en retira, par le procédé habituel, le sel euivrique si caractéristique de la proline, sel qui, on le sait, contient 2 molécules d'eau de cristallisation par atome de cuivre. Le rendement en sel cuivrique recristallisé n'était que de $0^{gr},1$.

Séché dans le vide à 70^0, $0^{gr},0955$ de sel d'une belle couleur bleue perdait $0^{gr},0103$ (10,79 %; calculé: 10,99 %). A la suite de la dessiccation, le sel prenait une belle teinte violette.

$0^{gr},0801$ du sel séché donnait, d'après le procédé de Kjeldahl, une quantité d'ammoniaque correspondant à $7^{mgr},65$ d'azote (9,55 %; calculé 9,61 %).

3. Acide α-monobenzoylamino-δ-guanido-n-valérique (Monobenzoylarginine racémique synthétique).

$NH_2 \cdot C(:NH) \cdot NH \cdot CH_2 \ CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH(NH \cdot CO \cdot C_6H_5) \cdot COOH.$

0,1 molécule-gramme d'ornithine α-monobenzoylée (produit B + produit C + un peu de produit A (p. 123)) fut dissous dans 250 cc. de lessive de baryte saturée à froid contenue dans un matras bouché, et à cette solution on ajouta 33 gr. de cyanamide fraîchement préparée et dissoute dans 100 cc. d'eau. Il ne se produisit pas de dépôt immédiatement; mais au bout de deux jours environ, on vit la combinaison guanidique recherchée se séparer en quantité abondante sous forme d'un dépôt pulvérulent mélangé de gros cristaux limpides de dicyanamide. Laissant séjourner le matras en l'agitant de temps à autre, on a vu le dépôt augmenter; mais au bout de quelques jours la cyanamide avait tellement diminué, qu'une prise enlevée et additionnée d'une solution ammoniacale de nitrate d'argent a seulement donné naissance à un petit dépôt presque blanc. C'est pourquoi on a ajouté encore 30 gr. de cyanamide et plus tard 30 gr. en substance, qu'on fit dissoudre dans le liquide en agitant, du reste sans effet visible.

Après un mois d'abandon à la température du laboratoire, on fit séjourner le ballon deux jours dans la glacière, pour séparer alors le dépôt par filtration à la trompe et pour le laver d'abord à l'eau glacée, ensuite une fois avec une solution d'hydroxyde barytique réfrigérée à la glace (afin de dissoudre la monobenzoylornithine qui aurait pu échapper à la réaction), et finalement quatre fois à l'eau glacée.

Le dépôt réduit en poudre fut épuisé à refus avec de l'eau bouillante et puis lavé bien soigneusement à l'eau chaude, ce qui eut pour effet que la dicyanamide et une très petite partie du composé guanidique entrèrent en solution aqueuse (filtratum A), tandis que la quantité principale dudit composé (très difficilement soluble même dans l'eau chaude), mélangée d'un peu de carbonate de baryte, resta indissoute.

Le dépôt lavé qui, desséché à l'air, pesait $17^{gr},2$, fut dissous dans 200 cc. d'eau + 25 cc. d'acide chlorhydrique 5-n, après quoi on précipita la baryte présente au moyen d'un léger excès d'acide sulfurique étendu. La liqueur filtrée fut rendue très légèrement alcaline au moyen de l'eau ammoniacale, ce qui fit précipiter à nouveau le composé guanidique. Après repos jusqu'au lendemain, on filtra, puis lava le dépôt, d'abord à l'eau froide, ensuite à l'eau chaude.

Rendement en acide α-monobenzoylamino-δ-guanido-n-valérique I (desséché à l'air): $15^{gr},8$.

L'évaporation de l'eau-mère et des eaux de lavage fournit $1^{gr},1$ de composé guanidique. De plus, le filtratum A (v. plus haut) en donna $0^{gr},9$ par évaporation, puis recristallisation de la dicyanamide résiduelle; ceci tient à ce que, comparativement à cette dernière, le composé guanidique se dissout beaucoup plus lentement et, une fois dissous, se dépose également moins vite. En dissolvant dans de l'acide chlorhydrique étendu les quantités obtenues plus haut, $1^{gr},1 + 0^{gr},9$, de composé guanidique, puis rendant neutre la solution au moyen d'ammoniaque, comme ci-dessus, on obtint:

l'acide α-monobenzoylamino-δ-guanido-n-valérique II: $1^{gr},8$.

En tenant compte de la teneur en eau, mentionnée plus loin, des produits I et II, on voit que le rendement en composé guanidique a été de $17^{gr},16$, donc 61,7 % de la quantité théorique.

$2^{gr},0808$ du produit I perdait, partie dans le vide sulfurique, partie dans le vide à 70^0, en tout $0^{gr},0500$ (2,4 %). Chauffée à 100^0 dans le vide, cette substance ne subissait pas de perte de poids ultérieure. Le produit II a perdu de la même manière 2,2 %.

$0^{gr},0616$ de substance I séchée donnait, d'après Kjeldahl, une quantité d'ammoniaque correspondant à $12^{mgr},33$ d'azote (20,02 %).

$0^{gr},0675$ de substance II séchée donnait, par le même procédé, une quantité d'ammoniaque correspondant à $13^{mgr},54$ d'azote (20,06 %).

$0^{gr},1405$ de substance I séchée donnait par combustion $0^{gr},0812$

d'eau (6,47 % d'hydrogène) et $0^{gr},2878$ d'acide carbonique (55,87 % de carbone).

		Calculé	Trouvé	
			I	II
C_{13}	156,00	56,08	55,87	
H_{18}	18,14	6,52	6,47	
N_4	56,04	20,15	20,02	20,06
O_3	48,00	17,25		
	278,18	100,00		

L'acide α-monobenzoylamino-δ-guanido-n-valérique est difficilement soluble dans les dissolvants neutres usuels. On peut néanmoins le recristalliser dans une quantité abondante d'eau chaude, d'où il se dépose dans le courant de deux ou trois jours sous forme d'un beau dépôt cristallin présentant sous le microscope des cristaux épais, prismatiques, bien formés, le plus souvent à six pans (toutefois le nombre des pans est quelquefois beaucoup plus considérable). L'acide guanidique est facilement soluble dans les acides chlorhydrique ou sulfurique étendus, mais difficilement soluble dans l'ammoniaque et les lessives de soude ou de baryte, même en excès.

L'acide guanidique ne fondait pas au bloc Maquenne en 5 secondes à 300°: la fusion ne s'est produite qu'à env. 315°, en 5 secondes, et en même temps on pouvait observer un noircissement de la matière.

Ce corps est de réaction neutre. Une addition de formol neutralisé n'y change rien.

Une solution de $0^{gr},2199$ de substance I séchée dans 10 cc. d'acide chlorhydrique 0,2-n, n'était pas tout à fait limpide; après addition de 10 cc. d'eau, de 10 cc. de formol neutralisé et de $14^{cc},55$ de lessive de soude 0,2-n, il a fallu, en outre, $4^{cc},55$ d'acide chlorhydrique 0,2-n pour reproduire la coloration de la solution témoin. Donc, l'addition de formol n'a pas donné lieu à un changement d'acidité.

Une arginine monobenzoylée préparée à partir d'un carbonate d'arginine naturelle, racémisée d'après Riesser[1]), ne montra également pas de changement d'acidité quand on y ajouta du formol neutralisé, et cette arginine monobenzoylée se comporta en tout et par tout comme l'acide α-monobenzoylamino-δ-guanido-n-valérique obtenu par la synthèse exposée plus haut.

[1]) Zeitschr. physiol. Chemie, **49**, 222 (1906).

4. Nitrate d'arginine synthétique racémique.

$C_6H_{14}N_4O_2, HNO_3$.

On fit évaporer à plusieurs reprises au bain-marie, en présence de 100 cc. d'acide chlorhydrique concentré, 0,05 molécule-gramme (13gr,9) d'arginine monobenzoylée synthétique. Cependant, ayant éprouvé des difficultés à séparer de cette façon tout l'acide benzoïque, on finit par chauffer pendant 6 heures, en présence de 100 cc. d'acide chlorhydrique concentré, dans un ballon placé dans un bain d'huile maintenu à une température de 140—150°. Après filtration de l'acide benzoïque séparé, épuisement de la liqueur à l'éther et évaporation au bain-marie, on fit dissoudre dans de l'eau le résidu constitué par le chlorure d'arginine, puis on ajouta, afin d'éliminer l'excès d'acide chlorhydrique, une dose de carbonate d'argent telle que la solution bien agitée accusa une réaction neutre. Après filtration, le chlorure d'arginine faisant partie de la solution fut converti en nitrate d'arginine par addition d'une quantité justement suffisante de solution de nitrate d'argent. Après avoir filtré de nouveau, on fit évaporer dans le vide jusqu'à un volume de 40—50 cc. Le lendemain on put constater que le nitrate d'arginine racémique difficilement soluble s'était déposé sous forme d'une croûte cristalline, qui, après pulvérisation, essorage, lavage à l'eau froide et dessiccation à l'air, pesait 7 gr. (Filtratum et eau de lavage A).

Recristallisé dans 40 cc. d'eau chaude, le nitrate d'arginine se déposa sous forme d'un beau dépôt incolore à grains cristallins; l'examen fait au microscope révéla des cristaux épais, prismatiques (à quatre ou six pans), pour la plupart terminés en pyramides.

Rendement: 3gr,93 de nitrate d'arginine synthétique recristallisé, c'est-à-dire environ 33,1 % du calcul (Filtratum et eau de lavage B).

Un échantillon de nitrate d'arginine racémique recristallisé en même temps et qui avait été préparé à partir du carbonate d'arginine naturelle racémisée, montrait sous le microscope exactement le même aspect[1]). Les nitrates d'arginine soit synthétique soit racémique, étaient anhydres et, séchés dans le vide sulfurique,

[1]) Comp. Fr. Kutscher, Zeitschr. physiol. Chemie, **28**, 90 (1899), et O. Riesser, *ibid.*, **49**, 224 (1906).

ils ne perdirent pour ainsi dire rien. Soumis à une détermination du point de fusion, les deux corps se comportèrent d'une manière identique: au bloc Maquenne ils fondaient à environ 230° en 5 secondes, pour se décomposer ensuite; à température un peu plus basse: 220°, ils mirent plus d'une minute à fondre, et il fallut deux à trois minutes pour que la substance fût intégralement fondue et noircie. L'analyse du nitrate d'arginine synthétique donna le résultat que voici:

Évaporée trois fois au bain-marie en présence d'acide sulfurique étendu, une dose de $0^{gr},1022$ donna, par le procédé de Kjeldahl, une quantité d'ammoniaque correspondant à $24^{mgr},13$ d'azote (23,61 %).

D'après Schultze-Tiemann, $0^{gr},5960$ donna $61^{cc},1$ d'oxyde azotique mesuré à $18°,5$ et à une pression de $576^{mm},8$; la proportion de NO_3 qui y correspond, est de $155^{mgr},48$ (26,09 %).

$0^{gr},2282$ donna par combustion $0^{gr},1331$ d'eau (6,53 % d'hydrogène) et $0^{gr},2531$ d'acide carbonique (30,25 % de carbone).

		Calculé	Trouvé
C_6	72,00	30,36	30,25
H_{15}	15,12	6,38	6,53
N_4	56,04	23,63	23,61
O_2	32,00	13,48	
NO_3	62,01	26,15	26,09
	237,17	100,00	

5. Nitrate cuivrique d'arginine racémique synthétique.

$$(C_6 H_{14} N_4 O_2)_2 Cu (NO_3)_2 (+ aq.).$$

Les filtratums et eaux de lavages A et B provenant de la préparation du nitrate d'arginine, furent chauffés au bain-marie en présence d'un grand excès de carbonate cuivrique. La solution ainsi obtenue, d'une couleur bleu foncé, fut rapprochée au bain-marie jusqu'à 30 cc. environ, puis laissée en repos à la température ordinaire, ce qui lui fit prendre la consistance d'une pâte formée exclusivement de longues et minces aiguilles microscopiques. Après repos jusqu'au lendemain, on essora à la trompe, puis lava le dépôt trois fois à l'eau froide, pour le faire recristalliser ensuite dans 20 + 5 cc. d'eau chaude. Abandonnée à elle-même jusqu'au lendemain, la solution se solidifia, formant une bouillie qui sous le microscope présentait des faisceaux et des

paquets de cristaux aciculaires bien formés. Essoré à la trompe, le sel fut lavé trois fois à l'eau froide.

Rendement en sel séché à l'air: $3^{gr},6$, c'est-à-dire, en tenant compte de la teneur en eau mentionnée plus loin, 25,9 % de la quantité totale correspondant à 0,5 molécule-gramme.

Un nitrate d'arginine cuivrique préparé en partant du nitrate d'arginine synthétique analysé et trouvé pur (v. plus haut) cristallisa d'une façon identique, et il en était de même pour deux sels préparés à partir d'échantillons d'arginine racémique naturelle. Par contre, O. Riesser[1]) indique que dans des solutions concentrées le sel cristallise «in gut ausgebildeten blauen Krystallen».

Séché à l'air, le sel était bleu; mais abandonné à lui-même dans le vide sulfurique du jour au lendemain, il perdit 3,57 % d'eau (calculé sur le sel anhydre: 3,71 %) et prit une teinte violette.

Évaporé trois fois au bain-marie en présence d'acide sulfurique, $0^{gr},0971$ de sel desséché donna d'après Kjeldahl une proportion d'ammoniaque correspondant à $20^{mgr},18$ d'azote (20,78 %).

$0^{gr},7183$ de sel hydraté, répondant à $0^{gr},6972$ de sel séché, donna d'après Schultze-Tiemann $62^{cc},7$ d'oxyde azotique, mesuré à 17^{0} et 762 mm. de pression; c'est-à-dire $161^{mgr},81$ NO_3 (23,36 % du sel anhydre).

Porté au rouge, $0^{gr},3836$ du sel hydraté, correspondant à $0^{gr},3699$ de sel séché, donna $0^{gr},0547$ d'oxyde cuivrique (11,81 % de cuivre dans le sel anhydre).

$0^{gr},2145$ de sel hydraté, répondant à $0^{gr},2068$ de sel séché, donna par combustion $0^{gr},1083$ d'eau et $0^{gr},2043$ d'acide carbonique (5,44 % d'hydrogène et 26,94 de carbone dans le sel anhydre).

		Calculé	Trouvé
C_{12}	144,00	26,87	26,94
H_{28}	28,22	5,27	5,44
N_8	112,08	20,92	20,78
O_4	64,00	11,94	
Cu	63,57	11,86	11,81
$(NO_3)_2$	124,02	23,14	23,36
	535,89	100,00	

Il nous reste à faire quelques remarques au sujet de la teneur en eau du nitrate cuivrique d'arginine racémique, teneur qui paraît

[1]) Zeitschr. physiol. Chemie, **49**, 225 (1906).

être sujette à de fortes variations. Les indications suivantes ont toutes été calculées sur le sel anhydre.

Ainsi qu'il a été dit, le sel synthétique mentionné plus haut renfermait 3,71 % d'eau, donc un peu plus de 1 molécule (3,36 %). Laissé dans le vide sulfurique du jour au lendemain, ce sel perdit toute son eau, pour la réabsorber par abandon à l'action de l'air atmosphérique ou — plus rapidement — par un séjour au-dessus de l'eau. Le sel reprit alors sa couleur bleue primitive. Il atteignit un poids constant lorsqu'il avait absorbé, en tout, 3,94 % d'eau.

L'autre nitrate cuivrique d'arginine synthétique mentionné ci-dessus se comportait d'une manière à peu près semblable. Il contenait 4,7 % d'eau, qu'il perdit du jour au lendemain dans le vide sulfurique. Abandonné ensuite à l'action de l'air, il absorba en vingt-quatre heures 3,67 % d'eau, c'est-à-dire plus d'une molécule; en même temps sa couleur repassa au bleu. Il n'atteignit un poids constant qu'après plusieurs jours d'abandon au-dessus de l'eau. La quantité totale d'eau absorbée était alors de 4,5 %.

Quant aux deux échantillons préparés à partir du nitrate d'arginine racémique naturelle, ils se comportaient d'une manière quelque peu différente. L'un deux contenait 6,71 %, l'autre 6,77 % d'eau (2 molécules d'eau: 6,72 %); par abandon dans le vide sulfurique, la totalité de leur eau se perdit du jour au lendemain, ce qui fit prendre à ces deux sels une teinte violette, légèrement moins marquée peut-être que celle des sels synthétiques. Abandonnés ensuite à l'action de l'air, les deux sels racémisés — malgré le fait qu'ils renfermaient primitivement une plus forte proportion d'eau que les sels synthétiques — réabsorbèrent l'eau bien plus lentement que ces derniers, fait qui ne peut pas tenir à une différence d'humidité de l'air, parce que les quatre sels étaient traités simultanément. Au bout de dix jours d'abandon à l'influence de l'air, le premier des sels racémisés n'avait absorbé que 1,34 % d'eau, et après avoir séjourné ultérieurement quinze jours au-dessus de l'eau, il n'accusait qu'une teneur en eau de 6,15 %. Pour le second sel, les chiffres correspondants étaient, respectivement, de 3,74 et de 6,77 %.

Après vingt-quatres heures de séjour dans le vide sulfurique, aucun de nos quatre sels ne subit une perte ultérieure de poids par dessiccation dans le vide à 100°.

Enfin, pour être complets, nous mentionnerons que, d'après O. Riesser *(loc. cit.)*, le nitrate cuivrique d'arginine racémique cristallise avec 3 molécules d'eau.

Quant à la cause des différences que nous venons de signaler, nous ne saurions l'indiquer.

6. Picrate d'arginine racémique synthétique.

$C_6 H_{14} N_4 O_2$, $C_6 H_3 N_3 O_7$.

Après addition de 20 cc. d'acide sulfurique 2-n., les eaux-mères et les eaux de lavage provenant des cristallisations du

nitrate cuivrique d'arginine synthétique mentionnées plus haut, furent privées de leur cuivre au moyen d'hydrogène sulfuré. Ayant chassé ce dernier par ébullition, on fit précipiter la solution par l'acide phosphotungstique; la quantité exigée était de 40 cc. d'une solution normale de cet acide.

Vu au microscope, le phosphotungstate précipité se montrait formé d'une matière microcristalline. Celle-ci était difficilement soluble dans l'eau même bouillante; toutefois une petite proportion se laissait facilement recristalliser et, par refroidissement de la solution, se déposa sous forme de beaux cristaux, dont l'aspect était pourtant très hétérogène. Sous le microscope on pouvait observer de longs prismes à quatre ou six pans et, d'autre part, des cristaux plus courts, souvent de forme tabulaire ou, plus rarement, presque lamellée, tandis que d'autres, groupés en faisceaux, étaient longs et minces, plutôt aciculaires.

Un phosphotungstate obtenu à partir du nitrate d'arginine racémisée se comportait d'une façon identique.

Essoré, puis lavé à l'eau froide, le phosphotungstate fut décomposé à l'aide d'un léger excès de lessive de baryte. Ayant eliminé la baryte à la manière habituelle, on fit évaporer la solution jusqu'à un volume de 130 cc., pour la précipiter ensuite au moyen d'un petit excès d'une solution alcoolique à environ 5 % d'acide picrique (quantité employée: 85 cc.). On vit alors le picrate se déposer sous forme de cristaux longs et minces prismatiques à quatre ou six pans, quelquefois un peu pointus, souvent bien formés. Après repos jusqu'au lendemain, on filtra, puis lava le dépôt trois fois à l'eau froide.

Rendement en picrate d'arginine racémique synthétique I: $5^{gr},55$.

Par évaporation de l'eau-mère et de l'eau de lavage, on obtint, en outre, du picrate d'arginine II: $1^{gr},16$.

Le rendement total en picrate se monte à 33,3 % de la quantité totale correspondant à 0,05 molécule-gramme.

Ainsi, la quantité totale (0,05 molécule-gramme) de la monobenzoylarginine synthétique mise en œuvre a permis de récupérer

33,1 % du calcul sous forme de nitrate d'arginine,
25,9 % » » » » » » cuivrique d'arginine
et 33,3 % » » » » » picrate d'arginine

en tout, 92,3 % du calcul.

La picrate d'arginine obtenu, recristallisé dans de l'eau, se déposa sous forme d'un beau dépôt volumineux qui, déjà à l'œil

nu, se montra constitué par des cristaux aciculaires; sous le microscope on remarqua presque exclusivement de longs cristaux prismatiques à quatre ou six pans, plus ou moins bien formés. Un échantillon de picrate d'arginine préparé en même temps à partir de carbonate d'arginine racémisée, picrate qu'on fit ensuite recristalliser, se comportait tout à fait de la même manière. O. Riesser[1]), par contre, affirme que le picrate d'arginine racémique cristallise »in kleinen glänzenden Prismen«.

Desséchés dans le vide à 100°, ni le picrate synthétique ni le picrate racémique ne perdirent rien; l'un et l'autre fondirent en 5 secondes au bloc Maquerne à 232°.

0gr,1672 de picrate d'arginine synthétique donna par combustion 0gr,0666 d'eau (4,46 % d'hydrogène) et 0gr,2177 d'acide carbonique (35,51 % de carbone).

		Calculé	Trouvé
C_{12}	144,00	35,71	35,51
H_{16}	17,14	4,25	4,46
N_7	98,07	24,33	
O_9	144,00	35,71	
	403,21	100,00	

7. δ-monobenzoylornithine.

$C_6H_5 \cdot CO \cdot NH \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH$.

On fait dissoudre dans un ballon, à la température ordinaire, 0,1 molécule-gramme (34 gr.) d'acide ornithurique dans 500 cc. d'acide chlorhydrique concentré et, après chauffage de la solution limpide ainsi obtenue pendant une heure au bain-marie bouillant, on distille l'acide chlorhydrique dans le vide, en employant, pour fermer le ballon, un bouchon de liège paraffiné, afin d'éviter que la solution ne noircisse sous l'influence des produits de décomposition provenant du bouchon.

Lorsqu'on fait bouillir dans 250 cc. d'eau la matière huileuse restante, dont la couleur est légèrement jaunâtre, le résidu prend la forme cristalline. Après un refroidissement complet, on a séparé par filtration le mélange d'acide benzoïque et d'acide

[1]) *l. c.*, p. 224.

ornithurique non converti; la liqueur filtrée (A) contenait alors, en tout, 513 mgr. d'azote.

En ajoutant encore 6 gr. d'acide ornithurique au mélanges d'acides benzoïque et ornithurique, puis renouvelant le traitement ci-dessus par 500 cc. d'acide chlorhydrique concentré, on obtint un filtrat (B) contenant, en tout, 580 mgr. d'azote et, d'autre part, un mélange d'acides benzoïque et ornithurique, mélange qu'on additionna de 6 gr. d'acide ornithurique, pour répéter ensuite le traitement à l'acide chlorhydrique; la liqueur filtrée (C) renfermait 565 mgr. d'azote. On ajouta encore au dépôt 5 gr. d'acide ornithurique, de sorte qu'on avait alors employé, en tout, 34 gr. + 17 gr. (0,15 molécule-gramme) d'acide ornithurique. Finalement, on traita ce mélange encore trois fois à l'acide chlorhydrique, sans addition ultérieure d'acide ornithurique.

Toutes les liqueurs filtrées provenant de cet essai, ainsi que toutes celles provenant d'un autre essai effectué tout à fait de la même manière et avec les mêmes proportions de substances, furent traitées ensemble. On élimina au moyen d'éther l'acide benzoïque, puis fit évaporer la solution aqueuse dans le vide. Ensuite on fit dissoudre le résidu dans de l'eau, sépara par filtration une faible proportion d'acide ornithurique et neutralisa par de l'ammoniaque la liqueur filtrée. Déjà au cours de la neutralisation, on put observer une abondante cristallisation de la monobenzoylornithine. Après abandon jusqu'au lendemain dans la glacière, on filtra, puis lava le dépôt soigneusement à l'eau glacée.

Rendement après dessiccation à l'air: $40^{gr},7$; de l'eau-mère et de l'eau de lavage on tira encore $9^{gr},8$. La totalité de la matière première étant de 102 gr. (0,3 molécule-gramme) d'acide ornithurique, le rendement total s'élève à environ 71 % de la théorie.

Par benzoylation de la dernière eau-mère on a récupéré $12^{gr},5$ d'acide ornithurique, et en faisant bouillir dans de l'eau le mélange d'acides benzoïque et ornithurique laissé par la dernière ébullition en présence d'acide chlorhydrique, on obtint $3^{gr},2$ d'acide ornithurique, donc en tout $15^{gr},7$ ou 15 % de la matière première.

Pour faire recristalliser la monobenzoylornithine, on en fit dissoudre la totalité ($50^{gr},5$) dans env. 1700 cc. d'eau chaude. Après filtration, la monobenzoylornithine commença bientôt à se

déposer à l'état d'un beau dépôt brillant de structure lamellée qui, vu au microscope, présentait l'aspect déjà connu de fines lames brillantes, rhomboïdales ou hexagonales[1]).

On a obtenu un produit A (à l'état desséché à l'air: 34^{gr},1) et, par évaporation de l'eau-mère, un produit B (13^{gr},5) de même aspect que A. La dessiccation dans le vide sulfurique des produits séchés à l'air, amena une perte d'env. 0,1 % en poids.

0^{gr},1452 du produit A donna, d'après Kjeldahl, une proportion d'ammoniaque correspondant à 17^{mgr},17 d'azote (11,83 %).

0^{gr},1152 de B donna, par le même procédé, une proportion d'ammoniaque correspondant à 13^{mgr},63 d'azote (11,83 %).

0^{gr},1619 de A donna par combustion 0^{gr},0983 d'eau (6,79 % d'hydrogène) et 0^{gr},3626 d'acide carbonique (61,08 % de carbone).

		Calculé	Trouvé A	Trouvé B
C_{12}	144,00	60,98	61,08	
H_{16}	16,13	6,83	6,79	
N_2	28,02	11,87	11,83	11,83
O_3	48,00	20,32		
	236,15	100,00		

La δ-monobenzoylornithine fond à une température comprise entre 285° et 288° (Bloc Maquenne, 5 secondes). Ce composé est difficilement soluble dans l'eau froide, assez difficilement dans l'eau chaude; l'alcool et l'éther ne le dissolvent guère.

La solution aqueuse accuse une réaction neutre; additionné de formol, le corps se laisse titrer nettement comme un acide monobasique.

A la titration au formol, 0^{gr},2643 exigea 5^{cc},51 d'une lessive de soude 0,2-n. (calculé: 5^{cc},60).

8. Désamination de la δ-monobenzoylornithine.

Après avoir mélangé, dans un ballon de 1 l. $^1/_2$, 0,05 molécule-gramme (11^{gr},8 du produit B) de δ-monobenzoylornithine, 12 gr. de nitrite de baryum et 120 cc. d'eau, on opéra la désamination dans un milieu très faiblement acide, dans le vide et à la température ordinaire, exactement de la même manière que dans le cas du composé α (p. 124). La δ-monobenzoylornithine étant encore plus difficilement soluble dans l'eau que le corps α, il se passa

[1]) E. Fischer, Ber. der d. chem. Ges., **34**, 463 (1901). S. P. L. Sørensen, Comptes-rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg, **6**, 52 (1902). E. Fischer et G. Zemplén, Ber. der d. chem. Ges., **42**, 1025 (1909).

un temps assez long avant que la totalité de celle-là entrât en dissolution, et à ce moment-là il s'était déjà formé un abondant dépôt du sel barytique difficilement soluble du produit de la désamination: acide α-oxy-δ-benzoylamino-n-valérique. Comme la δ-monobenzoylornithine facilement reconnaissable à sa structure lamellée avait apparemment disparu, on chauffa à 60°—70° en milieu neutre afin d'enlever au sel barytique qui s'était séparé, le dernier reste de monobenzoylornithine, après quoi on continua la désamination à la température ordinaire.

Dans cet essai on consomma également, en tout, 20 × 5 cc. d'acide chlorhydrique 0,2-n. (comp. p. 125). La désamination terminée, on refroidit à la glace du jour au lendemain, après quoi le sel barytique fut essoré et lavé à l'eau glacée.

Rendement en sel barytique I séché à l'air: 7gr,25.

L'eau-mère et celle de lavage furent évaporées dans le vide jusqu'à un volume de 50 cc., ce qui donna lieu à une nouvelle séparation de sel barytique. Malgré cela, on ajouta encore 2 gr. de nitrite de baryum, et ensuite on continua la désamination à la manière habituelle, en employant en tout 8 × 5 cc. d'acide chlorhydrique 0,2-n.; même après 6 à 8 heures d'évacuation, la réaction de la liqueur n'était devenue que neutre, pas alcaline. Le sel barytique séparé fut soumis au même traitement que plus haut.

Rendement en sel barytique II séché à l'air: 1gr,56.

Pour le traitement de la liqueur filtrée et de l'eau de lavage, voir plus loin, p. 145.

Desséché dans le vide sulfurique, le sel barytique I perdit 0,5 % le sel barytique II 1,2 % de son poids.

0gr,2732 de sel barytique I séché donna par le procédé de Kjeldahl une quantité d'ammoniaque correspondant à 12mgr,88 d'azote (4,71 %).

0gr,1729 de sel barytique II séché donna par le même procédé une proportion d'ammoniaque correspondant à 8mgr,24 d'azote (4,76 %).

Teneur en azote calculée: 4,60 %.

Ainsi le rendement total en sels barytiques séchés était de 7,21 + 1,54 = 8gr,75, soit 57,4% de la quantité théorique.

Dans un autre essai, effectué sur 11gr,8 de δ-monobenzoylornithine, produit A (p. 139), et dans lequel la désamination se continua pendant encore plus longtemps, le procédé étant d'ailleurs le même que précédemment, on obtint en tout 9gr,62 de sel barytique séché et suffisamment pur pour

l'analyse, soit 63,1 % de la quantité calculée (v. d'ailleurs p. 146).

Sel barytique de l'acide α-oxy-δ-benzoylamino-n-valerique. Pour faire recristalliser le sel barytique, on fit dissoudre 8 gr. de sel brut dans 300 + 100 + 100 cc. d'eau chaude; comme après filtration et refroidissement il n'y eut pas formation de dépôt, on ajouta, en remuant, un égal volume d'alcool. Au bout de quelques minutes, on vit tomber le sel barytique sous forme d'un beau dépôt cristallin blanc soyeux, qui sous le microscope présentait un aspect peu homogène, étant formé soit par de grandes lames hexagonales, soit par des aiguilles aplaties. Après quelques jours de repos, on essora à la trompe, puis lava le dépôt d'abord deux fois à l'eau glacée, ensuite à l'alcool étendu, et finalement à l'alcool absolu.

Sel barytique A séché à l'air: 5gr,2.

De l'eau-mère et de celle de lavage on put tirer de la même manière, par évaporation, puis précipitation à l'alcool:

Sel barytique B séché à l'air: 1gr,3.

Séchés dans le vide sulfurique, les sels séchés à l'air ne perdirent que 0,2 % env.

0gr,0420 de sel séché A donna d'après Kjeldahl une proportion d'ammoniaque correspondant à 1mgr,94 d'azote (4,62 %).

0gr,2160 de sel séché B, traité de la même manière, donna une proportion d'ammoniaque correspondant à 9mgr,80 d'azote (4,54 %).

0gr,0997 de sel séché A donna 0gr,0383 de sulfate de baryum (22,61 % de baryum).

0gr,1672 de sel séché B donna 0gr,0644 de sulfate de baryum (22,67 % de baryum).

Calculé: 4,60 % d'azote et 22,54 % de baryum.

Acide α-oxy-δ-benzoylamino-n-valérique. On fit dissoudre dans 1 l. d'eau chaude 11 gr. de sel barytique recristallisé, et à la solution ainsi obtenue on enleva le baryte au moyen de la quantité juste nécessaire d'acide sulfurique. Après filtration, on fit évaporer dans le vide, et le résidu huileux fut placé au-dessus de l'acide sulfurique, en remuant de temps en temps. Au bout de deux à trois jours, le produit huileux se figea en une masse cristalline facilement soluble dans l'eau et l'alcool et qui ne se laissait pas recristalliser dans des dissolvants miscibles avec l'eau, mais bien dans le benzène, dans lequel l'acide est cependant difficilement soluble, même à chaud. Environ 6 gr. de l'acide furent bouillis avec précaution et en agitant

bien (sans quoi l'acide fondait) avec 500 + 300 cc. de benzène, opération qui laissa indissoute la majeure partie de l'acide.

En soumettant la liqueur filtrée à un refroidissement lent et frottant avec une spatule, on vit l'acide *α*-oxy-*δ*-benzoylamino-n-valérique se déposer sous forme d'une matière cristalline blanche, que le microscope montra être constituée par des paquets et des faisceaux de cristaux aciculaires, en grande partie d'un aspect nettement prismatique.

Le rendement total était de $0^{gr},527$ d'acide séché à l'air, qui ne perdit rien par dessiccation dans le vide sulfurique.

$0^{gr},0772$ donna d'après Kjeldahl une quantité d'ammoniaque correspondant à $4^{mgr},58$ d'azote (5,93 %).

$0^{gr},1526$ donna par combustion $0^{gr},0890$ d'eau (6,53 % d'hydrogène) et $0^{gr},3392$ d'acide carbonique (60,62 % de carbone).

		Calculé	Trouvé
C_{12}	144,00	60,73	60,62
H_{15}	15,12	6,38	6,53
N	14,01	5,91	5,93
O_4	64,00	26,98	
	237,13	100,00	

L'acide *α*-oxy-*δ*-benzoylamino-n-valérique fond sur le bloc Maquenne en 5 secondes vers 85°.

Acide *α*-oxy-*δ*-amino-n-valérique. La matière laissée indissoute dans la recristallisation de l'acide *α*-oxy-*δ*-benzoylamino-n-valérique ainsi que la masse huileuse obtenue par la distillation de l'eau-mère benzénique, furent dissoutes dans de l'alcool étendu.

Après évaporation dans le vide, on chauffa le résidu au bain d'huile à env. 140° pendant 10 heures, en présence de 200 cc. d'acide chlorhydrique à 33 %. Après élimination de l'acide benzoïque libéré, on fit évaporer la solution, puis on chauffa de nouveau avec 200 cc. d'acide chlorhydrique à 33 % au bain d'huile à 140° pendant 6 heures, et comme il ne se forma pas d'acide benzoïque, il s'ensuit que la décomposition a été complète dès le premier chauffage avec l'acide chlorhydrique.

Après avoir fait évaporer au bain-marie, on élimina l'acide chlorhydrique restant à l'aide du carbonate d'argent, puis on soumit la solution à l'évaporation dans le vide jusqu'à consistance huileuse. Après repos jusqu'au lendemain, on observait un commencement de cristallisation. On fit alors dissoudre la matière dans

25 à 30 cc. d'eau, après quoi on sépara un peu de matière indissoute en filtrant. La liqueur fut additionnée de 100 cc. d'alcool à 93 %, ce qui a donné lieu d'abord à la formation d'un peu d'huile, mais au bout d'une heure, pendant laquelle on remua à plusieurs reprises, on vit recommencer la cristallisation. Le liquide surnageant la matière huileuse fut alors transvasé dans un gobelet, dans lequel, en remuant, on obtint en abondance une magnifique cristallisation d'acide α-oxy-δ-amino-n-valérique; examiné au microscope, le dépôt affectait la forme de petits cristaux prismatiques. Le lendemain on filtra, puis lava le dépôt à l'alcool à 80% et finalement à l'alcool absolu.

Rendement en acide α-oxy-δ-amino-n-valérique I séché à l'air: $3^{gr},15$.

De l'eau-mère et de l'eau de lavage on tira par évaporation, dissolution du résidu dans de l'eau, et précipitation au moyen de l'alcool comme précédemment:

l'acide α-oxy-δ-amino-n-valérique II qui, desséché à l'air, pesait: $0^{gr},65$.

L'eau-mère de ce produit contenait en tout $56^{mgr},8$ d'azote. Portee a l'ébullition pendant deux ou trois heures en présence du carbonate cuivrique, une prise de cette eau-mère n'a pris qu'une teinte très légèrement bleuâtre: par conséquent, le traitement très intense à l'acide chlorhydrique auquel nous avions soumis l'acide α-oxy-δ-amino-n-valérique, ne peut avoir produit que des quantités absolument négligeables de proline α, bien que l'odeur de pyrrolidine qui caractérise les solutions de proline se fît sentir constamment. Quant au rendement, nous rappellerons que les 11 grammes de sel barytique (506 mgr. d'azote) servant de matière première nous ont fourni $0^{gr},527$ d'acide α-oxy-δ-benzoylamino-n-valérique (31 mgr. d'azote), c'est-à-dire 6,1 % de la valeur théorique, et $3^{gr},8$ d'acide α-oxy-δ-amino-n valérique (401 mgr. d'azote), représentant 79,2 % de la théorie, ce qui fait un total de 85,3 % de la quantité calculée. Si l'on compte aussi les 57 mgr. d'azote contenus dans l'eau-mère, l'azote total retrouvé sera 489 mgr. au lieu des 506 mgr. contenus dans la matière première.

L'oxyacide aminé séché à l'air ne perdit rien dans le vide sulfurique; mais par une dessiccation subséquente dans le vide à 80°, son poids diminua légèrement (de 0,3 à 0,4 %).

0gr,1197 d'oxyacide aminé séché I donna d'après Kjeldahl une quantité d'ammoniaque correspondant à 12mgr,58 d'azote (10,51 %). 0gr,1371 d'oxyacide aminé séché I donna par combustion 0gr,1028 d'eau (8,39 % d'hydrogène) et 0gr,2260 d'acide carbonique (44,96 % de carbone).

		Calculé	Trouvé
C_5	60,00	45,08	44,96
H_{11}	11,09	8,33	8,39
N	14,01	10,53	10,51
O_3	48,00	36,06	
	133,10	100,00	

L'acide α-oxy-δ-amino-n-valérique se conduisait tout à fait de la manière indiquée par Fischer et Zemplén[1]): soumise à l'ébullition avec le carbonate de cuivre, sa solution aqueuse ne formait pas de sel cuivrique et, chauffé en présence de l'acide chlorhydrique, ledit oxyacide aminé ne produisait pas de quantités constatables de proline.

Chauffé dans un tube capillaire fermé du bas (la température s'élevait de 5° par minute), notre acide fondait à 190° (corr.); Fischer et Zemplén ont trouvé le point de fusion à 188—191° (corr.). Sur le bloc Maquenne il fondait en 5 secondes à 212° à 215°.

L'oxyacide aminé en solution aqueuse a une réaction neutre. Additionné de formol il peut être titré à la manière d'un acide monobasique.

La titration au formol de 0gr,2272 d'acide séché exigea 8cc,33 de lessive de soude au 1/5 (calculé: 8cc,54).

β-oxy-α-pipéridone. Suivant le procédé indiqué par E. Fischer et G. Zemplén[2]), 0gr,8 d'acide α-oxy-δ-amino-n-valérique fut converti, par fusion, en β-oxy-α-pipéridone; ensuite le produit brut fut recristallisé dans l'éther acétique. Ce procédé eut pour effet de faire cristalliser l'oxypipéridone facilement sous la forme d'aiguilles longues de deux à trois millimètres, visibles déjà à l'œil nu. L'examen au microscope montra de longs cristaux prismatiques, conformément à l'indication de Fischer et Zemplén. Rendement: 0gr,43.

[1]) Ber. der d. chem. Ges., **42**, 4882 (1909).

[2]) A l'endroit cité, p. 4884.

Desséchée dans le vide sulfurique, la substance préalablement séchée à l'air ne perdit rien.

0gr,0660 donna d'après Kjeldahl une quantité d'ammoniaque correspondant à 8mgr,00 d'azote (12,12 %).

0gr,1443 donna par combustion 0gr,1042 d'eau (8,08 % d'hydrogène) et 0gr,2747 d'acide carbonique (51,92 % de carbone).

		Calculé	Trouvé
C_5	60,00	52,14	51,92
H_9	9,07	7,88	8,08
N	14,01	12,17	12,12
O_2	32,00	27,81	
	115,08	100,00	

Chauffée dans un tube capillaire fermé du bas (élévation de température: 5° en une minute), la β-oxy-α-pipéridone fondit sans décomposition vers 140° (corr.); Fischer et Zemplén indiquent 141—142° (corr.). Sur le bloc Maquenne ledit corps fondit en 5 secondes à 139—140°.

La solution aqueuse de l'oxypipéridone avait une réaction neutre, laquelle n'a pas été altérée par l'addition de formol neutralisé.

Revenons maintenant à l'exposé de notre essai de désamination. Ainsi que nous l'avons mentionné à propos de la désamination de l'α-monobenzoylornithine (p. 124), la liqueur filtrée et l'eau de lavage provenant du sel barytique II (p. 140) furent débarrassées de l'excès de nitrite à l'aide du chlorure d'ammoniaque, et de l'ammoniaque par distillation dans le vide en présence d'un excès d'hydroxyde de baryum. Là-dessus la liqueur, ayant été rendue acide au moyen d'acide chlorhydrique, fut soumise à l'évaporation au bain-marie, et le résidu fut exposé, en présence de 100 cc. d'acide chlorhydrique concentré, pendant 8 heures, à une température de 140 à 150° dans un ballon placé au bain d'huile. Enfin on élimina l'acide benzoïque libéré par le chauffage ainsi que le chlorure de baryum et l'acide chlorhydrique présents.

Or, si la δ-monobenzoylornithine employée comme matière première avait été pure et que la désamination eût été quantitative et normale, la solution que nous avions obtenue n'aurait dû contenir que de l'acide α-oxy-δ-amino-n-valérique, mais pas d'acide α-amino-δ-oxy-n-valérique, ni même de proline α, attendu que, comme nous l'avons signalé plus haut (voir p. 143), l'acide α-oxy-δ-amino-n valérique ne forme pas de proline par chauffage en présence d'acide chlorhydrique. Conséquemment, la solution obtenue ne devrait donner aucun sel de cuivre par ébullition en présence de carbonate cuivrique.

Cependant l'essai donna pour résultat que le traitement au carbonate de cuivre fit prendre à la solution une coloration bleue, et par évaporation de la solution on arriva à obtenir 0gr,26 de sel

cuivrique d'une belle couleur bleue et cristallisant en tables rhomboïdales. Desséché dans le vide à 70°, le produit perdit 10,99 % d'eau et prit une teinte violette.

Il est hors de doute que nous étions en présence du sel cuivrique de la proline *α*, sel qui cristallise et se comporte justement de la manière que nous venons de décrire (pour la perte de poids que subit le sel cuivrique de la proline, le calcul donne précisément 10,99 %).

On était naturellement porté à conclure que la *δ*-monobenzoylornithine dont on était parti renfermait un peu du corps *α*, qui dans la désamination aurait donné de l'acide *α*-benzoylamino-*δ*-oxy-n-valérique, lequel, à son tour, à la suite de l'ébullition avec l'acide chlorhydrique, aurait donné naissance à la proline *α*. Il est pourtant probable que cette manière de voir n'est pas juste et que — comme il paraît ressortir de notre second essai de désamination (voir p. 140) — l'explication doit être cherchée, non pas dans une impureté de la matière première, mais bien dans une marche abnormale du processus de désamination.

Ce dernier essai fournit, comme il a déjà été dit (voir p. 140), en tout, $9^{gr},62$ de sel de baryte, soit 63,1 % de la valeur théorique. On enleva à l'eau-mère l'excès de nitrite au moyen de chlorure d'ammoniaque, puis on la débarrassa de l'ammoniaque par distillation dans le vide en présence d'un petit excès d'hydroxyde de baryum. Après acidulation au moyen d'acide chlorhydrique, on put alors observer la formation d'un dépôt cristallin blanc qui, lavé puis séché, pesait $0^{gr},75$ et qui fut reconnu comme étant formé d'acide benzoïque. En extrayant avec l'éther la solution aqueuse, dont la teneur totale en azote n'était que de 134 mgr., on put obtenir, en plus, $0^{gr},67$ d'une matière semi-solide qui ne contenait que $14^{mgr},2$ d'azote et qui, par conséquent, était sans doute également constituée en grande partie par de l'acide benzoïque,

On voit par là, premièrement, qu'au cours de la désamination il y a eu séparation d'acide benzoïque en quantité non négligeable (1 gr. de cet acide correspond à 16,4 % de la quantité mise en œuvre); puis, que lors de la désamination il y a eu départ d'une proportion d'azote supérieure à la quantité calculée, étant donné que les 134 mgr. d'azote présents ne représentent qu'environ 19 % de l'azote initial (0,05 grammes-équivalents d'azote = 700 mgr.), alors qu'après une désamination d'allure normale il devrait rester 37 % de l'azote initial, attendu que 63 % seulement de celui-ci avait été récupérés sous forme de sel barytique difficilement soluble.

Ceci se comprend cependant facilement; car une fois l'acide benzoïque séparé, il n'y a évidemment rien qui empêche que le groupe amine en position *δ* soit, lui aussi, influencé par le nitrite de baryum, de sorte que lors de la désamination, il y aurait départ, en tout, de plus d'un atome d'azote. En outre, il est encore possible que, après la séparation de l'acide benzoïque, la désamination, pour ce qui concerne une petite partie de la matière, n'ait eu lieu qu'en position *δ*, et non en position *α*, ce qui aura provoqué la formation d'acide *α*-amino-*δ*-oxy-n-valérique. On comprendra dès lors

que l'ébullition d'une telle solution avec l'acide chlorhydrique au bain d'huile puisse donner lieu à la formation de proline α. En conséquence, la formation de proline ne prouve point que la δ-monobenzoylornithine employée ait renfermé du composé α. D'un autre côté, l'essai en question ne permet pas non plus de conclure à la pureté de la matière initiale: il démontre seulement qu'elle a contenu au moins 63 % de δ-monobenzoylornithine.

Toutefois, nous estimons que le résultat de l'addition de cyanamide que nous allons décrire permet de conclure en toute sécurité que notre monobenzoylornithine δ a bien été pure ou que, tout au plus, elle n'a renfermé que des proportions inappréciables de composé α (v. p. 148).

9. Acide α-guanido-δ-monobenzoylamino-n-valérique.

$C_6H_5 \cdot CO \cdot NH \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH(NH \cdot C(:NH) \cdot NH_2) \cdot COOH.$

Dans un ballon fermé avec un bouchon on fit dissoudre 0,1 gramme-molécule de monobenzoylornithine δ (23gr,6 du premier produit mentionné à la page 139) dans 250 cc. de lessive de baryte saturée à froid, puis à la solution presque limpide ainsi obtenue on ajouta, en agitant, 30 gr. de cyanamide solide fraîchement préparée, laquelle entra en dissolution instantanément. Au bout de quelques minutes, on vit se déposer une matière cristalline lamellée qui, examinée au microscope, se montra être formée de monobenzoylornithine non transformée. Le lendemain on put observer un commencement de séparation de dicyanamide comme aussi du composé guanidique cherché, qui apparaissait sous forme d'un dépôt caséeux volumineux. Après encore un jour de repos, le tout s'était solidifié en une masse pâteuse.

Après quelques jours pendant lesquels on agita de temps en temps, on ajouta 100 cc. d'eau au mélange afin de le rendre plus liquide et de faire dissoudre la monobenzoylornithine non transformée qui avait pu s'en séparer. Ensuite on ajouta 30 gr., et plus tard encore 30 gr. de cyanamide à l'état solide.

Après, en tout, un mois de repos à la température ordinaire, on plaça le ballon 2 jours dans la glacière, puis essora le dépôt à la trompe et lava avec une solution d'hydroxyde de baryum refroidie à la glace (v. p. 129) et avec de l'eau glacée (filtrat et eau de lavage A).

Le dépôt réduit en poudre fut bouilli avec, en tout, 300 cc. d'eau (solution F), opération qui ne laissa qu'un peu de carbonate de baryte indissous. La quantité totale d'azote dans le filtre

avec le dépôt ne s'élevait qu'a $1^{mgr},1$. Ainsi, il ne s'est pas formé de quantités constatables de l'acide α-monobenzoylamino-δ-guanido-n-valérique très difficilement soluble même dans l'eau chaude (v. p. 129), et nous croyons pouvoir conclure de ce fait que la monobenzoylornithine δ employée avait été pure ou qu'elle n'avait renfermé, tout au plus, que des quantités inappréciables de composé α.

La solution F abandonnée au repos et refroidie, ne tarda pas à laisser tomber de la dicyandiamide sous la forme de gros cristaux limpides adhérant aux parois et au fond du vase; ce ne fut qu'après une ou deux heures, par contre, que le composé guanidique commença à se déposer sous forme de petites masses caseeuses. La dicyanamide déposée fut séparée par filtration et lavée une fois à l'eau, après quoi la liqueur filtrée, agitée et refroidie à l'eau glacée, fournit bientôt un dépôt très volumineux du composé guanidique en quantités si abondantes, que le tout se solidifia en une masse pâteuse. Après avoir fait séjourner celle-ci pendant quelques heures dans l'eau glacée, on essora à la trompe, puis on lava le dépôt quelques fois à l'eau refroidie à la glace. Dépôt I: Poids après dessiccation à l'air: $33^{gr},5$.

Après une forte évaporation de la liqueur filtrée et de l'eau de lavage, on les abandonna de nouveau à la cristallisation. La dicyandiamide ne tarda pas à se séparer, tandis que le composé guanidique ne commença que plus tard à cristalliser. On sépara alors par filtration la dicyandiamide, comme précédemment, après quoi la liqueur filtrée donna le dépôt II: qui, desséché à l'air, pesait $5^{gr},62$.

Enfin, de la liqueur filtrée et de l'eau de lavage provenant de ce dépôt, on put retirer, en opérant comme ci-dessus, un peu de dicyandiamide et le dépôt III qui, séché à l'air, pesait $2^{gr},91$.

La dicyandiamide que nous avions obtenue ne contenait qu'une très faible proportion du corps guanidique et put être purifiée presque complètement par une seule recristallisation dans de l'eau (la teneur en azote dosée dans un échantillon se chiffra par 65,27 %, dans un autre par 65,62 %, la valeur théorique étant de 66,66 %).

Séchés à l'air, les dépôts désignés plus haut par I, II et III, renfermaient un peu d'eau, qu'une dessiccation dans le vide sulfurique suffit pour éliminer. Les dépôts ainsi desséchés étaient

formés d'un mélange de dicyandiamide et du composé guanidique cherché, mélange qui bouilli en présence d'alcool absolu, puis refroidi dans l'eau glacée et finalement filtré, fournit le corps guanidique à l'état de pureté comme un reste indissous, la dicyandiamide entrant en dissolution alcoolique. Du dépôt I on retira ainsi, après ébullition avec 4 × 500 cc. d'alcool absolu, 12gr,4 de composé guanidique séché à l'air: produit A, qui renfermait 10,18 % d'eau. Traités ensemble de la même manière, les dépôts II et III fournirent 3gr,1 de corps guanidique, séché à l'air: produit B, contenant 9,62 % d'eau.

0gr,1136 de composé séché A donna d'après le procédé de Kjeldahl une proportion d'ammoniaque correspondant à 22,62 mgr d'azote (19,91 %).

0gr,0618 de composé séché B donna par le même procédé une proportion d'ammoniaque correspondant a 12mgr,34 d'azote (19,98 %).

La teneur calculée en azote est de 20,15 %.

Le rendement total en composé guanidique séché se chiffre par 13gr,94, soit la moitié de la valeur théorique.

Le rendement que nous venons d'indiquer représente le minimum, attendu que le composé guanidique n'est pas insoluble et que, par suite, il ne cristallise pas intégralement. C'est ainsi que, en partant de la première liqueur filtrée et de la première eau de lavage (A, v. p. 147), nous pûmes obtenir une portion ultérieure de ce composé. A cet effet, les liquides réunis, débarrassés au moyen d'acide carbonique de leur excès d'hydroxyde de baryum, furent évaporés dans le vide jusqu'à formation d'une masse pâteuse qui, à son tour, fut bouillie avec de l'eau. Par refroidissement de la solution ainsi obtenue, on vit cristalliser une forte quantité de dicyandiamide, et par évaporation de la liqueur filtrée il se sépara un mélange de dicyandiamide, de composé guanidique et de monobenzoylornithine non transformée, mélange duquel, après dessiccation dans le vide sulfurique, on put extraire la dicyandiamide à l'aide de l'alcool absolu. La matière restante séchée à l'air, pesait 3gr,03; après dessiccation dans le vide sulfurique, le poids était de 2gr,88. La substance desséchée renfermait 16,24 % d'azote et, par conséquent, se composait de parties à peu près égales de composé guanidique (20,15 % d'azote) et de monobenzoylornithine (11,87 % d'azote). Ces deux corps peuvent être séparés l'un de l'autre par traitement avec une solution froide d'hydroxyde de baryum, dans laquelle la monobenzoylornithine se dissout, alors que la presque totalité du composé guanidique reste indissoute. Par cette voie, en traitant le reste ci-dessus mentionné conjointement avec deux autres restes obtenus d'une façon analogue, nous parvînmes à isoler le composé guanidique presque à l'état de pureté absolue.

Dans le but de faire recristalliser le corps guanidique, on en fit dissoudre $12^{gr},3$ dans 400 + 40 + 40 cc. d'eau chaude. La cristallisation commença à se produire déjà avant que la solution filtrée se fût refroidie: il apparut, par-ci par-là, de petites globules cristallines bien caractéristiques, dont la dimension s'accrût de plus en plus jusqu'à ce que la matière, bien agitée, se prit en une masse épaisse pâteuse (dépôt caséeux) qui, vue au microscope, accusa exclusivement de petites conglomérations d'aiguilles minuscules.

Laissé pendant quelques heures dans l'eau glacée, le produit fut essoré à la trompe, et le dépôt lavé quelques fois à l'eau glacée.

Acide α-guanido-δ-benzoylamino-n-valérique I: Poids après dessiccation à l'air: $11^{gr},17$.

Par évaporation de l'eau-mère et de celle de lavage, on put en retirer un second produit qui, séché à l'air, pesait $1^{gr},9$. Le composé recristallisé renferme une plus forte quantité d'eau de cristallisation que la matière première et, par conséquent, pèse plus que celle-ci.

En ce qui concerne la teneur en eau du produit obtenu, nous ferons remarquer ce qui suit: Quand on le retire du mélange contenant de la dicyandiamide en l'épuisant avec l'alcool absolu bouillant, puis séchant à l'air, il renferme ordinairement env. 11 % d'eau (calculée ici comme dans la suite sur la substance anhydre), donc un peu moins de deux molécules d'eau (12,95 %); une seule fois la teneur en eau d'une substance ainsi préparée s'élevait à 12,91 %.

Recristallisée, puis séchée à l'air, la substance contient un peu plus de 3 molécules d'eau (19,87 à 20,52 % d'eau; calculé sur 3 molécules: 19,43 %).

Desséché dans le vide sulfurique, le produit cède toute son eau dans le courant de deux ou trois jours. La substance anhydre ainsi obtenue est très hygroscopique: abandonnée à l'influence de l'air elle absorbe en quelques jours environ 1 molécule d'eau (6,48 %). Plus tard l'absorption d'eau se ralentit. Elle dépend dans une certaine mesure du degré d'humidité de l'air; de cette façon nous n'avons pu faire absorber que 8,36 % d'eau tout au plus.

Puisque le produit complètement sec est très avide d'eau, nous avons fait porter l'analyse sur une préparation séchée qui, abandonnée à l'air, avait réabsorbé de l'eau.

$0^{gr},9310$ de substance hydratée perdit dans le vide sulfurique, en tout, $0^{gr},0579$ (6,22 % du poids de la substance hydratée, 6,63 de celui de la substance anhydre).

$0^{gr},1459$ de substance hydratée, renfermant $0^{gr},1368$ de matière sèche, donna d'après Kjeldahl une proportion d'ammoniaque correspondant à $27^{mgr},57$ d'azote (20,15 % d'azote dans la matière sèche).

0gr,2437 de substance hydratée, contenant 0gr,0152 d'eau et 0gr,2285 de matière sèche, donna par combustion 0gr,1479 d'eau et 0gr,4682 d'acide carbonique (6,50 % d'hydrogène et 55,88 % de carbone dans la matière sèche).

		Calculé	Trouvé
C_{13}	156,00	56,08	55,88
H_{18}	18,14	6,52	6,50
N_4	56,04	20,15	20,15
O_3	48,00	17,25	
	278,18	100,00	

L'acide *α*-guanido-*δ*-benzoylamino-n-valériqne est assez facilement soluble dans l'eau chaude, mais difficilement soluble dans l'eau froide; l'alcool et l'éther le dissolvent à grand'peine.

Le point de fusion n'a pu être déterminé avec précision; la matière complètement sèche fondait sur le bloc Maquenne en 5 secondes à environ 175°.

Le produit accusait une réaction neutre, et ici pas plus que dans le cas du composé guanidique isomère (v. p. 131) une addition de formol n'amène de modification à ce fait.

L'acide *α*-guanido-*δ*-amino-n-valérique ne forme pas de proline *α* par ébullition en présence d'acide chlorhydrique fort. — Dans un ballon muni d'un réfrigérant ascendant et placé au bain d'huile à une température de 140° à 150°, on chauffa pendant 20 heures 2 gr. d'acide *α*-guanido-*δ*-amino-n-valérique en présence de 100 cc. d'acide chlorhydrique fort. Là-dessus on procéda à l'évaporation au bain-marie et à l'élimination de l'acide benzoïque. A la solution, dont le volume était de 200 cc. environ, on ajouta d'abord 200 cc. d'une solution saturée de chlorure mercurique (une addition d'eau de baryte provoqua alors la formation d'un précipité franchement jaune), puis 500 cc. de lessive de baryte saturée à froid. Après filtration du précipité ainsi produit, le liquide ne contenait, en tout, que 5mgr,2 d'azote. Etant donné que la proline ne précipite pas par le chlorure mercurique et la lessive de baryte[1]), il s'ensuit que les quantités de proline formées au cours de notre essai ont été peu appréciables (si pas nulles), malgré le fait que, après l'élimination de la baryte, la liqueur filtrée avait durant l'évaporation une forte odeur de proline.

[1]) S. P. L. Sørensen et A. C. Andersen, ces mêmes Comptes-rendus, **7**, 82 (1908); Zeitschr. für physiol. Chemie, **56**, 247 (1908).

10. Sel chlorhydrique de l'anhydride α-guanido-δ-amino-n-valérique.

$$NH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \quad \begin{matrix} CH \cdot NH \cdot C : NH \\ | \qquad\qquad | \\ CO \text{ —— } NH \end{matrix} \quad , \; 2\,HCl.$$

Dans un ballon muni d'un réfrigérant ascendant on chauffa pendant 3 heures au bain d'huile à 140°—150° 10gr,3 d'acide α-guanido-δ-amino-n-valérique recristallisé, et ensuite on élimina par le procédé habituel l'acide benzoïque libéré. Toutefois, la scission n'avait pas été complète; car un chauffage réitéré de la même manière donna naissance à des quantités appréciables d'acide benzoïque. La scission ne fut complète que lorsque ce chauffage avec de l'acide chlorhydrique à 33 % eut été répété quatre fois, la quatrième chauffe n'ayant plus donné qu'une trace d'acide benzoïque.

La solution chlorhydrique, qui présentait une teinte brunâtre, fut traitée par le noir animal, qui cependant ne fit obtenir qu'une décoloration très incomplète. Alors on fit évaporer la solution dans le vide jusqu'à un petit volume et, après filtration, on la fit sejourner sur de l'acide sulfurique concentré et de l'hydroxyde potassique solide. Le résidu huileux ainsi obtenu ne tarda pas à se solidifier presque complètement. La matière fut alors triturée avec de l'alcool absolu; puis, après essorage, on lava soigneusement le reste indissous à l'alcool absolu, pour le faire recristalliser ensuite dans 5 × 100 cc. d'alcool absolu chaud en ajoutant à chaque 100 cc. d'alcool 10 gouttes d'acide chlorhydrique 5 n. En refroidissant et frottant les parois du verre avec une spatule, on vit le sel chlorhydrique se séparer sous forme d'un joli dépôt blanc cristallin qui, examiné au microscope, présentait des cristaux prismatiques bien formés, en grande partie groupés en étoiles. Le lendemain, on filtra, puis lava le dépôt trois fois à l'alcool absolu et ensuite à l'éther.

Sel chlorhydrique I (séché à l'air): 1gr,33.

L'eau-mère alcoolique, ayant subi 1° une évaporation dans le vide, qui avait eu pour effet une séparation ultérieure de sel, 2° un chauffage au bain-marie, qui avait fait rentrer le sel en dissolution, et 3° une filtration, donna après quelque temps de repos un second produit qui, vu au microscope, présentait tout à fait le même aspect que le premier produit et qui fut aussi traité de la même manière.

Sel chlorhydrique II (séché à l'air): 2gr,11.

Tandis que le sel I n'a rien perdu par dessiccation dans le vide sulfurique, le sel II a subi de cette façon une perte insignifiante (0,17 %).

0gr,0834 de sel I donna d'après Kjeldahl une proportion d'ammoniaque correspondant à 20mgr,29 d'azote (24,33 %).

0gr,0935 de sel séché II donna de la même manière une proportion d'ammoniaque correspondant à 22,76 mgr, d'azote (24,34 %).

0gr,2463 de sel I titré par le procédé de Volhard exigea 21cc,50 d'une solution norm. au 1/10 de nitrate d'argent, ce qui correspond à 76mgr,24 de chlore (30,95 %).

0gr,2958 de sel II séché traité par le même procédé exigea 25cc,77 de nitrate d'argent norm. au 1/10, correspondant à 91mgr,38 de chlore (30,89 %).

Les pourcentages d'hydrogène trouvés au cours des analyses élémentaires ont été trop élevés, ce qui est dû probablement à la teneur en acide chlorhydrique de la substance (après la combustion, l'eau renfermée dans la cuvette du tube au chlorure de calcium avait une réaction fortement acide). Quant aux résultats des dosages de carbone, ils concordaient avec le calcul.

0gr,1177 de sel I donna 0gr,0676 d'eau (6,43 % d'hydrogène) et 0gr,1351 d'acide carbonique (31,31 % de carbone).

0gr,0915 de sel II séché donna 0gr,0554 d'eau (6,78 % d'hydrogène) et 0gr,1056 d'acide carbonique (31,48 % de carbone).

		Calculé	Trouvé	
			I	II
C_6	72,00	31,43	31,31	31,48
H_{14}	14,11	6,16		
N_4	56,04	24,46	24,33	24,34
O	16,00	6,99		
Cl_2	70,92	30,96	30,95	30,89
	229,07	100,00		

Sur le bloc Maquenne les deux sels I et II fondaient en 5 secondes à environ 200°.

Le sel est facilement soluble dans l'eau, assez difficilement soluble dans l'alcool absolu même chaud, insoluble dans l'éther.

La solution aqueuse a une réaction fortement acide; mais après addition d'une dose d'hydroxyde sodique équivalente à 1 molécule d'acide chlorhydrique, la réaction devient neutre. Un quart de la quantité d'azote présente se laisse titrer au formol.

0gr,2597 de sel séché I exigea 5cc,60 de lessive de soude normale au 1/5 pour donner une réaction neutre sur le papier de tournesol, et en tout 5cc,72 pour donner avec la phénolphtaléine une coloration faiblement rouge (calculé pour 1 molécule d'acide chlorhydrique: 5cc,67). La titration au formol demanda, en tout, 11cc,22 de

lessive de soude normale au $\frac{1}{5}$ (calculé pour 1 molécule d'acide chlorhydrique + 1 équivalent d'azote titrable au formol $11^{cc},34$).

Une solution aqueuse du sel produisit avec l'acide phosphotungstique un volumineux précipité blanc; il en fut de même avec l'iodure double de mercure et de potassium ajouté d'un peu de lessive de soude.

Tandis qu'une solution acide ne précipita pas par le chloroplatinite de potassium, une solution neutralisée du sel mise en contact avec ce réactif laissa déposer, après des agitations répétées, un dépôt d'aiguilles microcristallines. Après recristallisation de ce dépôt dans de l'eau, on constata la formation de faisceaux et paquets d'aiguilles minuscules.

L'addition d'une solution d'acide picrique provoqua instantanément, aussi bien dans la solution aqueuse à réaction acide que dans la solution neutralisée, la formation d'un précipité volumineux que le microscope montra être constitué exclusivement par des petits cristaux aciculaires.

Une solution de $0^{gr},3$ de chlorhydrate II dans 20 cc. d'eau fut neutralisée par l'hydroxyde de sodium, puis précipitée au moyen d'une solution alcoolique d'acide picrique. Après addition de 10 cc. de solution à 5 % d'acide picrique, la précipitation n'était pas encore complète; elle ne le fut qu'après l'emploi de 20 cc. de cette solution. Il s'ensuit par un simple calcul que chaque molécule du composé guanidique exige plus d'une molécule d'acide picrique.

Le précipité fut essoré à la trompe, lavé quelques fois à l'eau froide et recristallisé dans l'eau chaude. Le picrate se déposa sous forme de longues aiguilles visibles à l'œil nu. Vues sous le microscope, celles-ci apparurent comme des cristaux aciculaires entremêlés de quelques cristaux épais, bien formés, prismatiques à six pans; quelques-uns de ces derniers cristaux étaient plutôt cunéiformes, terminés en pointe. Après abandon jusqu'au lendemain, on essora à la trompe, puis lava quelques fois à l'eau froide.

Rendement après séchage à l'air: $0^{gr},72$.

Par dessiccation dans le vide sulfurique, $0^{gr},7131$ de picrate préalablement séché à l'air perdit $0^{gr},0397$ (5,90 % de la substance déshydratée). Une dessiccation ultérieure dans le vide à 80° n'occasionna pas de perte.

$0^{gr},1100$ de picrate desséché donna par combustion $0^{gr},0315$ d'eau (3,20 % d'hydrogène) et $0^{gr},1417$ d'acide carbonique (35,13 % de carbone).

$$NH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH \cdot NH \cdot C{:}NH \\ \qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad \cdot \qquad\quad \cdot \quad , 2C_6H_2(NO_2)_3OH, 2H_2O \\ \qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad CO\text{——}NH.$$

		Calculé	Trouvé
C_{15}	216,00	35,17	35,13
H_{18}	18,14	2,95	3,20
N_{10}	140,10	22,81	
O_{15}	240,00	39,07	
	614,24	100,00	
$2H_2O$	36,03	5,87	5,90

Le picrate anhydre fondit sur le bloc Maquenne en 5 secondes à 240°—245°.

En partant de la liqueur filtrée provenant du chlorhydrate de l'anhydride α-guanido-δ-amino-n-valérique (v. p. 152), nous avons tenté d'isoler les chlorure et nitrate à réaction neutre de la base mentionnée (sels qui devaient contenir un équivalent d'acide pour chaque molécule du composé guanidique); mais nous n'avons pas réussi à obtenir ces corps à l'état de pureté.

On fit alors précipiter par l'acide phosphotungstique la solution légèrement sulfurique du composé. Le phosphotungstate précipité fut décomposé au moyen d'un excès de lessive de baryte, et la solution ainsi obtenue fut abandonnée au repos pendant quelques heures en vue de convertir l'anhydride α-guanido-δ-amino-n-valérique en l'acide correspondant. Nous n'avons pourtant pas réussi à préparer des sels purs de cet acide; le seul sel que nous avons pu tirer à l'état de pureté de la solution expérimentée est le picrate de l'anhydride α-guanido-δ-amino-n-valérique susmentionné, composé qui contient 2 molécules d'acide picrique pour une molécule de corps guanidique.

B. Dérivés de l'acide γ-cyanamidopropyle-phtalimido-malonique.

11. Ether γ-cyanamidopropyle-phtalimidomalonique.

$$(C_2H_5O\cdot CO)_2C<\begin{matrix}CH_2\cdot CH_2\cdot CH_2\cdot N:C:NH\\ N:(C_2O_2):C_6H_4.\end{matrix}$$

En opérant de la manière décrite antérieurement[1], on prépara de l'éther γ-bromopropyle-phtalimidomalonique à partir de 0,4 molécule-gramme d'éther phtalimidosodomalonique en le traitant par un grand excès de bromure de triméthylène. On obtint 160 gr. de substance brute huileuse sèche, ayant une teneur en brome de 15,64 %; par conséquent, comme le montre un calcul simple, l'huile contenait 83,4 %, soit 133,4 gr. d'éther γ-bromopropyle-phtalimidomalonique pur.

[1]) Ces mêmes Comptes-rendus, **6**, 149 (1905).

La moitié de l'huile obtenue fut dissoute dans 50 cc. de toluène renfermé dans un ballon de 1 l. muni d'un réfrigérant ascendant. A la solution ainsi obtenue on ajouta 24 gr. de cyanamide sodée[1]). Ayant bien agité, on chauffa pendant deux heures au bain d'huile, dont la température s'élevait lentement de 105° à 120°. Après refroidissement on ajouta 1/2 l. d'alcool absolu, puis on chauffa quelque temps au bain-marie bouillant. La solution, séparée par filtration d'un résidu indissous à réaction alcaline, fut précipitée après refroidissement par l'acide chlorhydrique. Additionnée de 5 cc. d'acide chlorhydrique 5-n., la solution présentait déjà une réaction acide; la dose totale d'acide était de 55 cc. 5-n. Après repos jusqu'au lendemain, on sépara par filtration le dépôt formé, qu'on lava trois fois à l'alcool absolu, et puis à l'eau jusqu'à ce qu'il fût exempt de chlore. Le dépôt était alors d'un blanc pur.

Ether γ-cyanamidopropyle-phtalimidomalonique I: 39gr,9 (séché à l'air).

L'eau-mère et l'eau de lavage furent étendues avec de l'eau, neutralisées au moyen de lessive de soude et délivrées par distillation du toluène et de l'alcool. Après avoir ajouté de l'eau, on sépara par filtration un peu d'huile qui s'était déposé, puis on fit précipiter la liqueur filtrée par 20 cc. d'acide chlorhydrique 5 n. On obtint ainsi une matière huileuse, qu'on fit dissoudre dans 50 cc. d'alcool absolu bouillant, qui par refroidissement laissa tomber un second produit. On traita celui-ci de la manière précédemment décrite. Son poids après dessiccation à l'air était de 7gr,4.

0gr,2270 de substance I séchée à l'air donna d'après Kjeldahl une quantité d'ammoniaque correspondant à 24mgr,6 d'azote (10,84 %).

0gr,2275 de substance II donna par le même procédé une quantité d'ammoniaque correspondant à 24mgr,6 d'azote (10,81 %).

Calculé: 10,86 % d'azote.

Le rendement total (47gr,3) se monte à 78 % de la quantité répondant à l'éther γ-bromopropyle-phtalimidomalonique contenu dans la matière première, et à 61,1 % de la proportion calculée sur la totalité de l'éther phtalimidosodomalonique mis en œuvre.

Dans un second essai effectué d'une manière analogue, en partant de la seconde moitié de l'huile ci-dessus mentionnée, on

[1] Préparée à partir de la cyanamide disodée commerciale, d'après la méthode décrite antérieurement (v. ces mêmes Comptes-rendus, **6**, 148, note (1905)).

obtint en tout 44 gr,7 (73,8 % et 57,7 %, respectivement, de la quantité calculée; v. plus haut).

Pour faire recristalliser, on fit dissoudre 40 gr. de la substance dans 500 + 100 + 50 + 50 cc. d'alcool absolu bouillant. Par refroidissement la cyanamide substituée se sépara sous forme d'un beau dépôt blanc cristallin; un examen au microscope montra des cristaux prismatiques courts et épais. Après essorage, puis lavage à l'alcool et dessiccation à l'air, le dépôt pesait 35 gr.

0 gr,2340 donna d'après Kjeldahl une quantité d'ammoniaque correspondant à 25 mgr,25 d'azote (10,79 %).

0 gr,2483 donna par combustion 0 gr,1249 d'eau (5,63 % de hydrogène) et 0 gr,5354 d'acide carbonique (58,71 % de carbone).

		Calculé	Trouvé
C_{19}	228,00	58,88	58,71
H_{21}	21,17	5,47	5,63
N_3	42,03	10,86	10,79
O_6	96,00	24,79	
	387,20	100,00	

Le composé fondait sur le bloc Maquenne en 5 secondes à 191°. Il est insoluble dans l'eau, difficilement soluble dans l'alcool froid, assez facilement soluble dans l'alcool absolu chaud, très difficilement soluble dans l'éther.

L'éther γ-cyanamidopropyle-phtalimidomalonique présente le caractère d'un acide monobasique, et peut être facilement titré avec la phénolphtaléine comme indicateur.

0 gr,3100, pour prendre une coloration légèrement rouge avec la phénolphtaléine, demanda 8 cc,15 de lessive de baryte normale au $^1/_{10}$ (calculé: 8 cc,01),

Le composé peut être porté a l'ébullition en présence d'acide chlorhydrique ou d'hydroxyde de sodium sans qu'il y ait séparation d'ammoniaque en quantité appréciable (v. d'ailleurs p. 159 et p. 160).

12. Ether γ-cyanamidopropyle-phtalimidomalonamidique.

$$C_2H_5O\cdot CO > C < \begin{matrix} CH_2\cdot CH_2\cdot CH_2\cdot N:C:NH \\ N:(C_2O_2):C_6H_4. \end{matrix}$$
$$\qquad\qquad NH_2\cdot CO$$

On fait dissoudre $^1/_{15}$ molécule-gramme d'éther γ-cyanamidopropyle-phtalimidomalonique (26 gr.) dans 500 cc. d'eau ammoniacale concentrée renfermée dans un ballon. Après quinze jours

d'abandon a la temperature ordinaire, on fait évaporer la solution dans le vide a 50 cc. environ, puis on la précipite au moyen de 20 cc. d'acide sulfurique 5 n. Il se précipite une huile qui, après vingt-quatre heures de séjour dans la glacière, se solidifie completement. La masse cristalline réduite en poudre est délivrée de son acide sulfurique par des lavages à l'eau glacée. Rendement apres dessiccation a l'air: 19 gr. Teneur totale en azote: 2730 mgr. v. le dosage ci-après, = 73 % de la quantité d'azote de la matière première.

0gr,9181 perdit dans le vide sulfurique 0gr,0581 (6,33 % du poids du sel hydraté, 6,76 % de celui de la substance anhydre).

0gr,1063 de matière sèche donna d'après Kjeldahl une proportion d'ammoniaque correspondant à 16mgr,31 d'azote (15,34 %).

0gr,3312 de matière sèche donna par combustion 0gr,1432 d'eau (4,84 % d'hydrogène) et 0gr,6678 d'acide carbonique (54,99 % de carbone).

Calculé: 56,95 % de carbone, 5,06 d'hydrogène et 15,65 % d'azote.

Le composé brut, qui manifestement n'était pas parfaitement pur, pouvait être purifié complètement par des recristallisations répetees dans l'alcool à 70 %. L'éther amidé se sépara alors sous forme d'agrégats hémisphériques mamillaires qui, examinés au microscope, se présentaient en cristaux prismatiques, presque aciculaires.

0gr,7601 de matière séchée à l'air perdit dans le vide sulfurique 0gr,0574 (7,55 % du poids de la matière hydratée, 8,17 de celui de la matière sèche).

0gr,0874 de matière sèche donna d'après Kjeldahl une quantité d'ammoniaque correspondant à 13mgr,55 d'azote (15,50 %).

0gr,2397 de matière sèche donna par combustion 0gr,1059 d'eau (4,94 % d'hydrogène) et 0gr,5016 d'acide carbonique (57,07 % de carbone).

0gr,2799 de matière sèche donna de la même manière 0gr,1227 d'eau (4,91 % d'hydrogène) et 0gr,5844 d'acide carbonique (56,94 % de carbone),

		Cnlculé	Trouvé	
C_{17}	204,00	56,95	57,07	56,94
H_{18}	18,14	5,06	4,94	4,91
N_4	56,04	15,65	15,50	
O_5	80,00	22,34		
	358,18	100,00		

La formule rationnelle indiquée ci-dessus concorde parfaitement avec les faits suivants:

D'abord, le corps renferme en tout cas un groupe carboxethyle; car le traitement par une solution d'hydroxyde de baryum a pour effet de faire séparer de l'alcool, qui peut être décelé soit au moyen de la réaction par gouttelettes de Pasteur, soit par la formation de iodoforme. Et puis, en faisant bouillir en présence d'acide chlorhydrique, on peut faire séparer un quart de l'azote présent à l'état d'ammoniaque. Enfin, le composé possède le caractère d'un acide monobasique, caractère qui, de même que dans le cas de l'éther γ-cyanamidopropyle-phtalamidomalonique, ne peut être dû qu'à la présence d'un groupement cyanamide.

13. Acide γ-cyanamidopropyle-phtalimidomalonamidique.

$$\begin{matrix} NH_2 \cdot CO \\ HO \cdot CO \end{matrix} > C < \begin{matrix} CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot N : C : NH \\ N : (C_2\,O_2) : C_6\,H_4. \end{matrix}$$

On fit dissoudre dans 200 cc. d'eau de baryte saturée à froid 11 gr. d'éther γ-cyanamidopropyle-phtalimidomalonamidique (produit brut mentionné p. 158) renfermant 1580 mgr. d'azote. Après abandon jusqu'au lendemain, il s'était séparé un peu de dépôt qui, examiné au microscope, montra exclusivement des aiguilles extrêmement fines, souvent groupées en étoiles, fait qui laisse soupçonner que nous avions affaire à une faible proportion du sel barytique de l'acide tribasique facilement soluble, mentionné dans le chapitre suivant (v. p. 160). Sans avoir égard au dépôt, on ajouta 20 cc. d'acide chlorhydrique 5-n., ce qui rendit la solution tout à fait limpide. Cependant, en remuant, on vit l'acide γ-cyanamidopropyle-phtalimidomalonamidique se déposer sous la forme de longs cristaux prismatiques, tantôt obliquement tronqués par un ou deux plans. Après avoir fait séjourner 2 jours dans la glacière, on filtra, puis on lava le dépôt à l'eau glacée jusqu'à ce qu'il fût exempt de chlore.

Rendement après dessiccation à l'air: $7^{gr},4 = 79{,}6$ % de la proportion correspondant à la teneur en azote de la matière première.

Desséchée dans le vide sulfurique la matière séchée à l'air ne subit pas de perte.

$0^{gr},1195$ donna d'après Kjeldahl une proportion d'ammoniaque correspondant à $20^{mgr},25$ d'azote (16,95 %).

Calculé: 16,98 % d'azote.

Ainsi que le montre le titrage ci-après, le composé présente le caractère d'un acide bibasique.

$0^{gr},1447$ exigea, pour virer à la phénolphtaléine, $8^{cc},95$ de lessive de baryte normale au $^1/_{10}$ (théorie: $8^{cc},77$).

14. Acide γ-cyanamidopropyle-phtalimidomalonique.

$$(HO \cdot CO)_2 C < \begin{matrix} CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot N : C : NH \\ N : (C_2 O_2) : C_6 H_4 \end{matrix}.$$

On fit dissoudre en agitant à la température ordinaire 0,01 molécule-gramme ($3^{gr},9$) d'éther γ-cyanamidopropyle-phtalimidomalonique dans 100 cc. d'eau de baryte saturée à froid. La solution limpide, obtenue au bout de quelques minutes, ne tarda pas à faire tomber un dépôt blanc, dont la quantité au bout de deux ou trois heures était considérable; deux jours après, le tout s'était pris en une masse pâteuse qui, vue au microscope, se présentait en aiguilles très fines, en grande partie groupées en étoiles.

Après addition d'acide chlorhydrique en quantité telle (10 cc. d'acide normal environ) que la matière prit une réaction très légèrement acide, on essora à la trompe, puis on débarrassa le dépôt de son chlore par des lavages avec de l'eau glacée.

Sel barytique séché à l'air de l'acide γ-cyanamidopropyle-phtalimidomalonique: $5^{gr},9$, rendement voisin du calcul.

Par dessiccation, d'abord dans le vide sulfurique, ensuite dans le vide à 110^0, $0^{gr},8700$ de sel barytique séché à l'air perdit, en tout, $0^{gr},1120$ (12,87 % du poids du sel hydraté, 14,78 % de celui du sel anhydre).

$0^{gr},2081$ du sel anhydre donna d'après Kjeldahl une quantité d'ammoniaque correspondant à $16^{mgr},25$ d'azote (7,81 %).

$0^{gr},2701$ de sel anhydre donna de la même manière une quantité d'ammoniaque correspondant à $21^{mgr},15$ d'azote (7,83 %).

$0^{gr},1855$ de sel anhydre donna $0^{gr},1213$ de sulfate de baryum (38,48 % de baryum).

Calculé pour un sel anhydre de composition $(C_{15} H_{10} N_3 O_6)_2 Ba_3$: 7,87 % d'azote et 38,58 % de baryum.

L'acide est donc tribasique.

Dans le but d'isoler l'acide libre, on versa sur le sel barytique la dose calculée d'acide sulfurique 2-n., pour séparer ensuite par filtration le sulfate de baryum formé. Evaporée dans le vide, la solution laissa l'acide libre à l'état d'une matière dure facilement soluble dans l'eau, l'alcool, l'acétone et l'éther acétique,

moins soluble dans l'éther et le benzène. De la solution dans l'éther acétique on put précipiter, au moyen de l'éther, l'acide à l'état d'une masse huileuse, qu'on ne réussit cependant pas à faire cristalliser.

Ainsi qu'il a déjà été dit au début de ce mémoire, le traitement des cyanamides substituées ci-dessus décrites à l'eau ammoniacale, à l'ammoniaque liquide et par des sels d'ammonium, soit à la température ordinaire, soit en chauffant en vase clos, ne nous a pas fourni de composés guanidiques, abstraction faite de très faibles quantités de guanidine libre. Nous croyons pouvoir en conclure que la synthèse de l'arginine racémique ne saurait être réalisée par cette voie.

Juin 1911.

SUR L'EMPLOI DU ROUGE DE MÉTHYLE AU MESURAGE COLORIMÉTRIQUE DE LA CONCENTRATION EN IONS HYDROGÈNE

PAR

SVEN PALITZSCH.

AYANT reconnu, à la suite de quelques essais faits dans notre laboratoire, que le réactif indicateur rouge de méthyle préparé par Rupp et Loose[1]) s'applique parfaitement aux mesurages colorimétriques de la concentration en ions hydrogène, nous avons procédé à en définir la région de virage ainsi que les «écarts» qu'il accuse en présence de sels, de matières protéiques, *etc.* Pour cela nous avons employé le même procédé que celui suivi pour les nombreux indicateurs décrits dans les «Etudes enzymatiques II»[2]) comme aussi pour l'α-naphtolphtaléine examinée plus tard[3]).

Rouge de méthyle» est la dénomination technique proposée par Rupp et Loose pour l'acide p-diméthylamino-azobenzène-o-carbonique ou — suivant la nomenclature proposée dans «Enz. II» — acide diméthylanilino-azo-o-benzène-carbonique.

Pour l'examen du rouge de méthyle nous avons employé une préparation provenant de Kahlbaum. La recristallisation de celle-ci, ne provoquant pas de changement sensible dans la manière dont elle se comporte lors du mesurage colorimétrique, peut être considérée comme étant superflue.

On chauffa 4 gr. de rouge de méthyle avec 30 cc. d'acide acétique glacial[4]). Après filtration, on étendit la solution avec de l'eau jusqu'à ce quelle commençât à se troubler; on fit disparaître ce trouble en chauffant ultérieurement, et finalement on refroidit rapidement. En

[1]) E. Rupp et R. Loose, Ber. der d. chem. Ges., **41**, 3905 (1908).

[2]) S. P. L. Sørensen, Comptes-rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg **8**, 1 (1909). Dans la suite ce mémoire est désigné par «Enz. II».

[3]) S. P. L. Sørensen et S. Palitzsch, *ibid.*, **9**, 1 et 8 (1910).

[4]) Comp. Rupp et Loose, *l. c.*, p. 3906.

opérant ainsi, on obtient la substance à l'état cristallin; si la quantité d'eau ajoutée est trop forte, il se forme, au contraire, un dépôt muqueux.

Comme solution indicatrice on se servait d'une solution de 0gr,1 dans 300 cc. d'alcool à 93 % + 200 cc. d'eau. Pour 10 cc. de liqueur expérimentée ou de comparaison on prenait le plus souvent 4 gouttes, quelquefois seulement 2 ou 3.

Le rouge de méthyle colore les solutions fortement acides en rouge violet foncé, tandis que les solutions faiblement acides, neutres ou alcalines deviennent jaunes.

C'est ainsi que 4 gouttes de la solution indicatrice donnent à

«5,5 citrate + NaOH»[1])	une	coloration		jaune
«8,0 — — »	-	—		orange
«10 — — »	-	—		rouge jaunâtre
«8 citrate + HCl»	-	—		rouge
«5 — — »	-	—		rouge violet

Le virage le plus net (c'est-à-dire la plus grande différence de coloration pour la plus petite différence de concentration en ions hydrogène) se trouve entre «6 citrate + HCl» ($p_H^+ = 4{,}2$) et «5,5 citrate + NaOH» ($p_H^+ = 6{,}3$).

Dans ce domaine une différence dans la concentration en ions hydrogène correspondant à une différence de 0,1 dans la valeur de p_H^+, donne lieu à une différence de teinte très marquée.

Suivant son domaine de virage, le rouge de méthyle est situé à la limite qui sépare les indicateurs du groupe azoïque de ceux des mélanges de phosphates («Enz. II», p. 108). Sa composition fait ranger cet indicateur dans le premier groupe, et il présente notamment une certaine analogie avec les deux derniers termes de celui-ci: α-naphtylamino-azo-benzène et acide α-naphtylamino-azo-para-benzènesulfonique, qui figurent tous les deux sur la liste des indicateurs particulièrement appropriés (N°s 11 et 12, «Enz. II», p. 118).

Dans «Enz. II» nous trouvons, à la page 96, une liste d'un grand nombre de matières colorantes du groupe azoïque, avec leurs zones de virage. En raison de son groupe COOH, le rouge de méthyle n'appartient à aucune des six séries figurant à l'endroit cité; on pourrait, par contre, établir la série que voici:

[1]) «Enz. II», p. 42.

Dimethylanilino-azo-benzène	$p_H^+ = 2{,}9—4{,}0$
Acide dimethylanilino-azo-benzènesulfonique	$p_H^+ = 3{,}1—4{,}4$
Acide dimethylanilino-azo-o-benzènecarbonique	$p_H^+ = 4{,}2—6{,}3$

Alors que l'introduction du groupement sulfonique (en position p) n'apporte pas de modification essentielle à la région de virage («Enz. II», p. 97), il paraît en être autrement lorsque le groupe COOH est introduit (en position o).

Les colorations produites par le rouge de méthyle sont bien plus pures et bien plus fortes que celles qu'on obtient avec les N°s 11 et 12, en sorte que la liqueur expérimentée se laisse ranger plus exactement parmi les liqueurs de comparaison. Afin de pouvoir juger si le rouge de méthyle offre d'autres avantages que celui de différences de coloration plus prononcées, nous examinons généralement dans la suite les N°s 11 et 12 simultanément avec le rouge de méthyle.

A l'instar de la plupart des autres matières colorantes azoïques, le rouge de méthyle ne change pas de couleur même après quelques jours d'abandon.

En ce qui concerne l'influence qu'exerce le toluène et le chloroforme, je l'ai recherchée par le procédé indiqué dans «Enz. II», p. 77, en agitant «8 citrate + NaOH» soit avec du toluène, soit avec du chloroforme, puis filtrant et colorant avec le rouge de méthyle. En saturant ainsi par l'un ou l'autre de ces deux antiseptiques, je ne pus cependant pas observer de changement de couleur. Toutefois, lorsqu'on les emploie en grande proportion, ils extraient la matière colorante, qui leur donne une teinte jaune. Ainsi, sous ce rapport, le rouge de méthyle rappelle les colorants azoïques acides.

Influence des sels neutres. Ainsi qu'il a été démontré antérieurement[1]), l'addition de sels amène une modification dans la couleur indicatrice, ce qui est dû non seulement à la modification provoquée par les sels dans la concentration des ions hydrogène de la solution, mais aussi à l'influence qu'ils exercent sur l'indicateur. Nos expériences sur ce sujet ont porté particulièrement sur le chlorure de sodium, parce que ce sel est utilisé si souvent dans les recherches de physiologie. Un mélange de phosphates déterminé (v. «Enz. II» 42) dont la concentration était $^1/_{15}$ mol., fut additionnée d'une dose de chlorure sodique

[1] «Enz. II», p. 77; S. P. L. Sørensen et S. Palitzsch, *l. c.*, p. 11.

telle que la solution devint, respectivement, 0,5 ou 0,7 mol. relativement à ce sel, et l'on détermina alors la concentration en ions hydrogène tant par électrométrie que par colorimétrie. Pour faire la mesure colorimétrique nous nous sommes servi, comme liqueurs de comparaison, de mélanges de citrates («Enz. II», p. 42). Puisque, ainsi que le montre le tableau IV, il y a une différence — bien minime, il est vrai — entre la teinte du rouge de méthyle dans un mélange de citrates et un mélange de phosphates de même concentration ionique, il pourrait sembler plus logique d'employer des mélanges de phosphates aussi comme liqueurs de comparaison; pourtant, dans les cas de concentration en ions hydrogène auxquels le rouge de méthyle présente son meilleur virage, l'emploi de ces mélanges a été reconnu comme étant peu avantageux (comp. «Enz. II», p. 45).

Dans les tableaux ci-dessous on a indiqué «l'erreur de sel», c'est-à-dire la différence, exprimée en p_H^+, entre le résultat de la mesure colorimétrique et celui de la mesure électrométrique (électr. ÷ col.).

Tableau I.

Mélange de phosphates $^1/_{15}$ mol., chlorure de sodium 0,5 mol.

Mélange de phosphates	«0,25 sec.»	«0,80 sec.»	«1,5 sec.»
Mesuré par electrom. p_H^+ = ...	4,84	5,35	5,67
Erreur de sel du rouge de méthyle	÷0,01	÷0,01	+0,01
— — - N° 12	÷0,02	+0,04	+0,10[1])
— — - - 11	0,00	+0,01	—

Tableau II.

Mélange de phosphates $^1/_{15}$ mol., chlorure de sodium 0,7 mol.

Mélange de phosphates	«0,25 sec.»	«0,80 sec.»	«1,5 sec.»
Mesuré par électrom. p_H^+ = ...	4,74	5,25	5,55
Erreur de sel du rouge de méthyle.	÷0,02	÷0,01	÷0,02
— — - N° 12	÷0,03	+0,04	+0,08
— — - - 11	+0,01	+0,04	÷0,02

(Pour les solutions exemptes de sel p_H^+ est de 5,29 — 5,81 — 6,10, respectivement; ainsi l'addition de 0.5 mol. de chlorure de sodium diminue p_H^+ de 0,45 — 0,46 — 0,43, et l'addition de 0,7 mol. de chlorure de sodium, de 0,55 — 0,56 — 0,55).

Ces tableaux font voir que pour le N° 12 l'erreur de sel varie sensiblement avec la concentration ionique, fait qu'on n'a pas observé pour aucun des indicateurs examinés antérieurement.

[1]) Une mesure analogue mentionnée dans «Enz. II» p. 77, a donné le même résultat.

Dans le cas du rouge de méthyle les erreurs de sel trouvées sont en deçà des erreurs expérimentales; toutefois, cette règle ne s'applique pas à tous les cas, comme nous pourrons le voir par les déterminations qui suivent.

Tableau III.

Mélange de phosphates 1/150 mol.: «0,25 scc.», teneur en sel différente.

Chlorure de sodium	0,0 mol.	0,1 mol.	0,25 mol.	0,50 mol.	1,0 mol.
Mesuré par électrom. p_H^+ =	5,48	5,19	5,03	4,91	4,65
Erreur de sel du rouge de méthyle	÷0,01	÷0,05	÷0,12	÷0,07	÷0,08
Erreur de sel du N° 12..	÷0,15	÷0,12	÷0,11	÷0,06	÷0,05
— — - - 11..	÷0,27	÷0,15	÷0,08	÷0,04	÷0,02

Si l'erreur de sel diminue à mesure que la quantité de sel augmente, cela tient à ce que les liqueurs de comparaison sont 0,1 mol. relativement au citrate; mais, par contre, si l'on avait employé des mélanges de phosphates de même concentration (1/150 mol.) que les liqueurs expérimentées, l'erreur de sel pour le «0,0 mol. chlorure de sodium» aurait évidemment égalé zéro, et, compté de ce point, il serait allé en augmentant en proportion de la quantité de sel. Les nombres relatifs au mélange de phosphates exempt de sel marin montrent, en outre, que pour les N°s 11 et 12 une modification de la teneur phosphatique donne lieu à une erreur de sel considérable, tandis que dans le cas du rouge de méthyle l'erreur paraît être peu importante. C'est pourquoi dans les tableaux IV et V nous avons déterminé l'erreur de sel pour une proportion variable de phosphates dans des solutions dont quelques-unes ne contiennent pas de chlorure de sodium et dont les autres sont 0,5 mol. par rapport à ce sel.

Tableau IV.

«0,25 scc.», sans chlorure de sodium, teneur en phosphates différente.

Teneur en phosphates	1/150 mol.	1/60 mol.	1/15 mol.
Trouvé par électrom. p_H^+ = ...	5,48	5,43	5,29
Erreur de sel du rouge de méthyle	+0,01	+0,04	+0,02 [1]
— — - N° 12	÷0,15	÷0,06	0,00
— — - - 11	÷0,27	÷0,22	÷0,02 [1]

[1] Ces écarts tiennent à ce que, ici de même que dans les autres essais relatés dans le présent mémoire, on s'est servi, comme liqueurs de comparaison, de mélanges de citrates au lieu de phosphates.

Tableau V.

«0,25 sec.», chlorure de sodium 0,5 mol., teneur en phosphates différente.

Teneur en phosphates	$^1/_{150}$ mol.	$^1/_{30}$ mol.	$^1/_{15}$ mol.
Trouvé par électrom. p_H^+ = ...	4,91	4,85	4,84
Erreur de sel du rouge de méthyle	÷0,07	÷0,02	÷0,01
— — - N° 12	÷0,06	÷0,03	÷0,02
— — - - 11	÷0,04	÷0,04	0,00

Quant à l'influence exercée par les protéines et leurs produits de décomposition, elle est assez considérable pour la plupart des colorants azoïques. Pourtant le rouge de méthyle s'applique parfaitement même aux solutions de protéines naturelles, pourvu que l'on tienne compte de la divergence passablement constante entre la concentration en ions hydrogène trouvée par la mesure colorimétrique et celle que donne la mesure électrométrique.

Ayant constaté que, en ce qui concerne les N°s 11 et 12, l'écart provoqué par le blanc d'œuf de poule dépend de la concentration en ions hydrogène, nous avons entrepris une suite d'essais dans le but d'éclaircir ce point.

Tableau VI.

Différence, exprimée en p_H^+, entre les mesures colorimétrique et électrométrique (électr. ÷ col.) de solutions chlorhydriques à environ 2 % de blanc d'œuf de poule naturel.

p_H^+ Mesuré par électrom.	Rouge de méthyle	N° 12	N° 11
4,65	—	+0,06 [1])	—
4,99	+0,24	+0,12	÷0,08
5,16	+0,18	+0,26	÷0,03
5,34	—	+0,27 [1])	—
5,53	+0,26	+0,40	+0,14
5,60	+0,21	+0,43	+0,19
5,68	+0,27	+0,51	+0,22
5,75	+0,27	+0,68	+0,25

Ainsi donc, le rouge de méthyle présente sur les indicateurs N°s 11 et 12 l'avantage que l'écart produit par le blanc d'œuf de poule est le même pour toutes les concentrations ioniques considérées; de plus, le rouge de méthyle permet d'effectuer la comparaison colorimétrique d'une façon très sûre parce que, au contraire de tant d'autres indicateurs, il ne forme pas avec les

[1]) Ces nombres sont extraits de »Enz. II«, p. 105.

Tableau VII.

Composition des solutions examinées	Coloration des liqueurs de comparaison	Trouvé par électrométrie	Mesure colorimétrique par		
			Rouge de méthyle (4,2—6,3)	Acide α-naphtylamino-azo-p-benzènesulfonique (3,5—5,7)	α-naphtylamino-azobenzène (3,7—5,0)
		p_H^+	p_H^+	p_H^+	p_H^+
Solution chlorhydrique de caséine à env. 1 % + phosphate secondaire (1/50 mol.) + NaCl (0.1 mol.)	2 gtt. d'hélianthine II 1 - de brun de Bism. 3 - de violet de méthyle 3 - $BaSO_4$	5,66	5,58	5,71	5,75
Solution chlorhydrique à env. 2 % de sérum dialysé + phosphate primaire (1/50 mol.)	2 - d'hélianthine II 1 - de brun de Bism.	4,73	5,83	> 6,00	> 6,00
Solution analogue, mais légèrement plus chlorhydrique	—	3,96	4,75	> 6,00	5,56
Solution chlorhydrique à env. 2 % de caséine partiellement decomposée par la pepsine	1 1/2 - de brun de Bism.	5,57	5,48	5,46	5,44
Solution à env. 2 % de gélatine + phosphate primaire (1/150 mol.)	3 - d'hélianthine II 1/2 - de brun de Bism. 1 - $BaSO_4$	5,56	5,51	5,51	5,57
Solution chlorhydrique à env. 2 % de gélatine + phosphate primaire 1/150 mol.)	—	5,17	5,17	5,19	5,29
Solution chlorhydrique à env. 2 % de peptone Witte + NaCl (0.1 mol.)	5 - d'hélianthine II 2 - de brun de Bism. 2 - de violet de méthyle	4,88	4,91	4,91	4,87
Solution analogue, mais avec plus de NaCl (0.5 mol.)	—	4,83	4,83	4,85	4,75
Solution chlorhydrique à env. 2 % de blanc d'œuf de poule partiellement dégradé par la pepsine; 16,8 % d'azote titrable au formol exprimé en % de l'azote total)	2 - d'hélianthine II 1/2 - de brun de Bism.	5,63	5,58	5,60	5,58
Solution analogue, légèrement plus chlorhydrique	—	5,27	5,19	5,21	5,21
Solution analogue, mais plus dégradée (20,5 % d'azote titrable au formol	3 - d'hélianthine II	5,27	5,24	5,24	5,26

protéines des combinaisons incolores ou faiblement colorées, et que dans les solutions protéiques il ne prend pas d'autres teintes que dans les liqueurs de comparaison.

Pour plus de clarté, nous avons réuni dans le tableau VII (p. 168) les résultats de mesure de quelques autres protéines naturelles ainsi que de quelques protéines plus ou moins décomposées par la pepsine.

Il ressort de ce tableau que le rouge de méthyle se comporte à peu près de la même manière que les N°s 11 et 12. Pour ce qui concerne les produits de décomposition de protéines, la différence entre les mesures colorimétrique et électrométrique est généralement très faible (souvent même elle ne surpasse pas celle due aux erreurs d'expérience); par contre, dans le cas du sérum dialysé l'écart est assez considérable.

Pour la mesure colorimétrique d'extraits aqueux légèrement acides de farine de froment[1]), le rouge de méthyle s'est montré de beaucoup mieux approprié que l'indicateur N° 12 qui, contrairement au rouge de méthyle, se trouve souvent absorbé en quantité considérable par les matières colloïdales de la solution, avec formation de composés jaunes ou incolores, en sorte qu'une comparaison colorimétrique exacte est rendue impossible.

La différence, exprimée en p_H^+, entre les mesures électrométrique et colorimétrique de ces extraits en présence du rouge de méthyle, variait suivant la composition de ceux-ci, de + 0,20 à ÷ 0,25 (électr. ÷ col.).

En somme, vu les faits que nous venons d'exposer, le rouge de méthyle peut être recommandé comme un excellent indicateur pour les mesures colorimétriques des concentrations en ions hydrogène comprises entre $p_H^+ = 4,2$ et $p_H^+ = 6,3$.

[1]) Les concentrations ioniques de pareils extraits de farine ont été mesurées d'une manière fort étendue à propos de recherches faites par M. Jessen-Hansen sur la valeur boulangère de la farine de froment, recherches dont on trouvera la description dans le prochain mémoire.

Juin 1911.

ETUDES SUR LA FARINE DE FROMENT.

I. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN IONS HYDROGÈNE[1]) SUR LA VALEUR BOULANGÈRE DE LA FARINE.

PAR

H. JESSEN-HANSEN.

Introduction.

Au cours d'une suite d'essais auxquels pendant plusieurs années je me suis livré occasionnellement dans le but de rechercher la corrélation qui pourrait exister entre la composition chimique d'une certaine farine de froment et la qualité ou valeur boulangère de cette même farine, j'ai remarqué un fait resté inobservé jusqu'ici et qui n'est pas sans importance pour la solution de ce problème si vivement débattu, de même qu'il n'est pas sans présenter un certain intérêt au point de vue de la pratique de la boulangerie. C'est pourquoi dans ce qu'on va lire je ferai l'exposé sommaire des résultats auxquels je suis arrivé jusqu'à ce jour.

Fait-on du pain suivant toutes les règles de l'art avec de la farine de froment dont on fait la pâte dans de l'eau distillée additionnée de sel marin et de levure en proportions convenables, on a constaté qu'en ajoutant à l'eau un acide quelconque, le poids spécifique du pain cuit subit des modifications sensibles, en ce sens qu'il diminue lorsqu'on augmente les doses d'acide jusqu'à une certaine limite, pour s'accroître ensuite à nouveau, sans qu'on soit obligé d'en ajouter des quantités telles que le goût du pain s'en ressente en devenant aigre.

De plus, il a été constaté qu'une telle addition d'acide n'influe pas seulement sur le poids spécifique du pain, mais encore sur

[1]) Pour la signification de ce terme, v. S. P. L. Sørensen, Etudes enzymatiques II, Comptes-rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg, **8**, 1 (1909).

la qualité en général, de telle sorte qu'une dose déterminée, assez faible, d'un acide peut avoir pour effet d'amener à leur plus haut degré de développement la plupart des propriétés qui dans leur ensemble constituent ce que dans la pratique on appelle la valeur boulangère de la farine, telles que la forme, la teinte extérieure et intérieure, la délicatesse de la porosité. En d'autres termes, il a été établi qu'il existe une concentration en ions hydrogène optimale pour la valeur boulangère en général, ou en tout cas pour la presque totalité des diverses propriétés qu'on a coutume de comprendre sous cette désignation. Le rendement, par contre, ne semble pas se ressentir d'une addition d'acide.

Ces constatations faites, le premier problème à résoudre devait être celui de trouver cette concentration ionique optimale, et de rechercher si elle était toujours la même quelle que fût d'ailleurs la qualité de la farine.

En principe, la manière de procéder à la solution de ce problème était très simple: On n'avait qu'à effectuer une série d'essais de cuisson de pain en ajoutant à l'eau devant servir à faire la pâte, des quantités différentes d'un acide quelconque, et mesurant la concentration en ions hydrogène des pâtes ainsi préparées; du reste, on n'aurait qu'à les traiter et les cuire selon les règles de l'art, puis à déterminer le poids spécifique des pains cuits, pour comparer ensuite les différentes valeurs appartenant ensemble des deux quantités, soit en les réunissant en tableau synoptique ou, ce qui serait mieux, en construisant des courbes dont l'abscisse représenterait l'exposant des ions hydrogène[1]), l'ordonnée de même le poids spécifique ou plutôt la valeur réciproque de celui-ci: le volume spécifique[2]) du pain, puisque c'est ce dernier qui constitue l'expression la plus directe de la valeur boulangère de la farine. Dans ce dernier cas, l'abscisse du sommet de la courbe indique la concentration optimale en ions hydrogène, c'est-à-dire la concentration à laquelle la farine considérée possède la plus grande valeur boulangère. En répétant les mêmes opérations sur d'autres échantillons de farine, on obtiendrait alors, si la concentration ionique était le seul facteur déterminant, des courbes coïncidant avec celle construite en premier lieu, abstraction faite bien entendu des erreurs expérimentales,

[1]) V. S. P. L. Sørensen, à l'endroit cité.

[2]) C'est-à-dire, le volume, exprimé en centimètres cubes, de 1 gr. de pain.

tandis que l'existence d'autres facteurs se révélerait par une configuration différente des courbes représentant des farines différentes.

Cependant, si le principe de la recherche est bien simple, l'exécution comporte pas mal de difficultés. Tout d'abord, la préparation même du pain est une opération assez complexe, au cours de laquelle nombre de facteurs difficiles à contrôler (tels que la pratique du boulanger, diverses circonstances d'ordre psychologique, la qualité du levain, et d'autres encore) peuvent entrer en jeu et fausser le résultat. — En outre, l'autre côte de la question: la détermination de la concentration des ions hydrogène de la pâte n'est également pas une opération simple. Nous reviendrons sur ce point plus tard.

A. Méthodes expérimentales.

1. Manière d'effectuer les essais de cuisson.

En ce qui concerne tout d'abord la cuisson du pain, nous avons tâché autant que possible et d'éliminer les facteurs qui ne se laissent pas contrôler, et d'en limiter l'influence.

D'abord, c'est un boulanger habile et ayant la pratique de son métier qui a effectué les essais de cuisson au laboratoire sur mes indications et sous ma surveillance continuelle.

En deuxième lieu, nous avons, autant que possible, exécuté le même jour et avec le même levain tous les essais qui devaient être comparés directement. Comme nous avons été à même de faire cinq essais en un jour, il s'ensuit que les essais d'un jour suffisent pour la construction de la courbe mentionnée plus haut, pourvu qu'on ait eu soin de choisir des concentrations ioniques convenablement différentes.

En troisième lieu, nous avons répété les essais trois ou plusieurs fois en des jours différents, pour prendre ensuite la moyenne des résultats comme l'expression définitive du volume spécifique pour la concentration ionique en question.

En quatrième lieu, je n'ai mis le boulanger au courant du résultat que j'attendais de chaque essai qu'après avoir terminé celui-ci; de même, en répétant une série d'essais, j'en ai à son insu varié l'ordre.

Enfin, nous avons toujours, autant que possible, employé du levain de même âge et de même qualité. Le levain utilisé était de l'aérolevure que la distillerie et fabrique de levure »For-

tuna« avait obligeamment mise à ma disposition. Je me fais un devoir de remercier encore ici le directeur de la fabrique, M. P. J. Thomsen, de la bienveillance qu'il m'a témoignée en cette circonstance. Nous envoyions chercher le levain chaque jour à la fabrique, immédiatement après qu'il avait été pressé, et nous en faisions emploi ordinairement le même jour. Ce n'est que dans les dernières séries d'essais que pour diverses raisons il a été plus commode d'envoyer chercher le levain la veille de son emploi et de le conserver entre-temps dans une glacière. Il ne parait cependant pas que les résultats s'en soient ressentis en aucune façon.

On pourrait peut-être objecter que j'aurais dû employer une culture préparée au laboratoire d' un levain pur de boulangerie afin d'être plus sûr d'opérer toujours avec des matériaux identiques. Je crois cependant que le procédé que j' ai suivi m'a donné la plus grande somme de garantie sous ce rapport; car l'identité d'un levain ne consiste évidemment pas seulement dans la pureté inaltérée de la race, mais il importe aussi, et peut-être même encore davantage, que son état physiologique en général reste le même. Et en tout cas, dans un produit de laboratoire où l'on n'opère que sur de faibles quantités et où, par suite, le hasard peut venir à jouer un rôle important, il me semble qu'il y a moins lieu de s'attendre à ce que cette dernière condition soit remplie, que dans un produit fabriqué en grand, où l'une des conditions principales d'un résultat commercial avantageux est précisément que la marchandise soit constamment aussi égale que possible et où, par conséquent, il importe tout autant que dans une expérience scientifique de chercher à obtenir cette constance. Quoiqu'il en soit, les résultats que j'ai obtenus ne semblent pas devoir me faire regretter mon choix, bien que de temps à autre des phénomènes se soient produits que, à défaut d'autre explication, nous avons cru devoir mettre sur le compte du levain.

Voici le mode opératoire que nous avons suivi pour nos essais de cuisson de pain:

Pour chaque essai on a mis en œuvre:

1° Farine de froment, 1100 gr. environ, un peu plus ou un peu moins selon la qualité de la farine, qui était pesée avec la précision de $\pm$ 2 gr. (Les limites d'erreur indiquées sont des valeurs maximales),

2° Sel marin, 5 gr. ± 25 mgr.,
3° Levure, 15 gr. (± 25 mgr.), et
4° Liqueur, 650 cc. (± 2 cc.).

On a toujours preparé à la fois une quantité de liqueur telle qu'elle devait suffire pour tous les essais qu'on avait l'intention de faire avec une liqueur de cette composition.

Pour commencer, on a pesé un peu plus (100 gr. environ) de farine qu'il n'en fallait pour l'essai. On a noté le poids et mis de côté provisoirement une petite portion, soit 1/6 à 1/7. On a mesuré la température de la farine, et l'on a saupoudré du sel marin la portion principale. La liqueur fut ensuite chauffée à une température telle que, additionnée à celle de la farine elle atteignît 40°, l'expérience ayant montré que la pâte finie obtient ainsi la température voulue: 25°. Je mesurai alors 650 cc. pour remettre cette portion au boulanger qui, après y avoir délayé la levure, fit la pâte avec la portion principale de la farine et autant de la petite portion qu'il jugea nécessaire pour donner à la pâte une consistance convenable. On mesura la température de la pâte achevée; elle ne s'est jamais écartée de 1° des 25°, et dans la majorité des cas elle ne s'en écartait même pas du tout. On plaça alors la pâte dans une caisse à fermentation, dont la température était maintenue, à l'aide de lampes électriques, autant que possible à 30°. (Dans nos derniers essais nous nous sommes servis comme caisse de fermentation d'une étuve à eau Rohrbeck, dont le thermomètre plongé dans l'eau était maintenu à 32°). — Afin d'empêcher une trop forte dessiccation de la surface, on a placé à côté de la pâte une écuelle contenant de l'eau.

Après une heure de repos, on pétrit la pâte une première fois, et après l'avoir laissée reposer encore une demi-heure dans la caisse à fermentation, on la soumit à une nouvelle malaxation. Immédiatement après, on fit de la pâte quatre pains d'égale grandeur, qu'on mit dans des moules en fer-blanc. On remit ceux-ci dans l'étuve afin de faire subir aux pains la dernière fermentation, qu'on interrompit en les enfournant lorsque le moment fut venu où le boulanger jugea que les pains étaient à point. La durée de cette dernière fermentation était différente pour les différentes sortes de farine; pour la fixer, on s'en remettait exclusivement à l'appréciation du boulanger.

En malaxant et formant les pains, on se servit de la petite portion de farine mise de côté au commencement de l'essai, tandis

que celle qui restait après que les pains avaient été mis dans les moules, fut pesée et défalquée de la quantité pesée originellement. La différence était alors le poids de la farine qui avait servi à faire les pains et qui était la base sur laquelle on calculait le rendement. Afin d'être bien sûr que, en appréciant la pâte, le boulanger ne se fondât chaque fois que sur son estimation personnelle de l'état actuel sans avoir égard aux quantités de farine employées dans d'autres essais, on lui laissait toujours ignorer combien de farine on avait pesée, quantité qui était variée dans des limites passablement étroites. Or, je pus constater que les écarts entre les quantités qu'il utilisait en répétant un même essai étaient généralement assez faibles, et j'estime que les calculs de rendement indiqués plus loin donneront en quelque sorte la mesure du degré de précision avec lequel nous avons travaillé.

La cuisson du pain se faisait dans un four d'essais provenant de MM. Christy Brothers et Cie à Chelmsford. Ce four est chauffé au moyen de l'électricité par cinq corps de chaleur composés de fils de résistance spiralés, dont trois se trouvent dans le fond du four, sous une grille sur laquelle les moules sont placés, tandis que les deux autres sont placés dans la partie supérieure. On eut soin que, au moment de l'enfournement des pains, le thermomètre fixé dans la porte du four marquât 230° et que cette température fût maintenue autant que possible durant tout le séjour des pains dans le four, c'est-à-dire une demi-heure[1]). Passé ce temps, on les retira du four pour les laisser refroidir jusqu'au lendemain. C'est seulement alors qu'on les pesa et qu'on en détermina le poids spécifique.

Cette détermination fut effectuée de la manière suivante: Une caisse, ou plutôt un verre cylindrique à parois épaisses et de dimensions convenables, fut rempli jusqu'à ras du bord de pois bien tassés, dont on enleva ensuite une partie pour mettre un des pains dans la caisse. On la remplit alors à nouveau avec des pois, qu'on tassa soigneusement comme la première fois, en tapant sous la caisse. Cela fait, on égalisa la surface, et l'on pesa les pois ainsi remplacés. Leur poids donne la mesure du volume du pain, qu'on rapporte alors à la mesure de capacité

[1]) Sur la grille, à côté des moules, on plaça un matras contenant de l'eau bouillante, afin de se rapprocher d'aussi près que possible des conditions existant dans un four ordinaire, où l'on fait toujours passer de la vapeur pendant la cuisson.

en le divisant par le poids de 1 l. de pois (au cas particulier 864 gr.).

Le procédé que je viens de décrire peut au premier abord sembler quelque peu primitif; mais des essais répétés m'ont convaincu que, pourvu qu'on apporte a ce travail tous les soins requis, deux déterminations, effectuées de cette manière, du poids spécifique d'un même pain ne différeront jamais entre elles que de 1 % tout au plus, et du moment que dans les autres déterminations relatives a la cuisson du pain on ne peut guère compter avec une plus grande précision, j'estime que c'est tout à fait suffisant et qu'il n'y a pas lieu de recourir à des procédés plus exacts mais en même temps plus compliqués, même si l'on arrivait à en imaginer.

Etant donné que dans chaque essai nous avons cuit 4 pains et que les essais ont ordinairement été répétés trois fois, il s'ensuit que les valeurs du volume spécifique données dans la suite représentent la moyenne des volumes spécifiques de 12 pains.

2. Détermination de la concentration en ions hydrogène.

Si maintenant nous passons à l'autre côte de la question, la détermination de la concentration des ions hydrogène de la pâte, il faut remarquer d'abord qu'elle ne peut en aucune façon être calculée sur la base de la dose d'acide ajoutée, parce que celle-ci est partiellement neutralisée par les constituants basiques de la farine. On n'y arrive pas davantage par une titration, vu qu'aucune methode de titrage ne peut renseigner sur le point qui seul présente de l'intérêt sous ce rapport, à savoir la concentration en ions hydrogène que possède la solution considérée au moment où l'on commence la titration. Une titration ne détermine que la proportion d'acide ou de base exigée pour changer la concentration ionique inconnue existant au commencement de la titration de façon à la faire coïncider avec celle qui détermine la fin du titrage et qui correspond au point de virage de l'indicateur choisi[1]). De plus, autant que je sache, il n'existe aucun autre procédé permettant de mesurer directement la concentration en ions hydrogène d'une pâte de farine.

[1]) S. P. L. Sørensen, *loc. cit.*, p. 8.

Aussi, cela n'est-il heureusement pas nécessaire. On peut se contenter de déterminer la concentration ionique d'une pâte «étendue» dans une proportion déterminée, à l'aide de l'une ou l'autre des deux méthodes proposées par S P. L. Sørensen[1]), à savoir par colorimétrie ou par électrométrie, et puis admettre que par cette détermination on arrivera à la concentration réelle des ions hydrogène de la pâte, multipliée par un facteur inconnu, il est vrai, mais qui ne dépend que de la dilution et dont on peut, par conséquent, faire abstraction à condition d'opérer toujours sur la même dilution.

En conséquence, le procédé employé a été le suivant:

Du liquide utilisé dans l'essai de cuisson en question on a mesuré la quantité qui dans les conditions de préparation de la pâte serait nécessaire pour faire une pâte avec 25 gr. de farine. On a complété cette quantité à 100 cc. dans une fiole avec de l'eau distillée bouillie. Ensuite on a mis 25 gr. de farine dans une fiole Erlenmeyer d'une capacité de 150 cc. Les deux fioles fermées avec des bouchons furent placées dans la glacière jusqu'au lendemain matin. Alors on répandit le liquide sur la farine[2]) et agita le tout fortement, en ayant soin de faire disparaître les grumeaux qui se formèrent. On laissa le mélange pendant deux heures dans la glacière, en agitant fréquemment. Dans la bouillie ainsi obtenue, la concentration des ions hydrogène fut alors déterminée par électrométrie et sans filtration, soit par le procédé indiqué par S. P. L. Sørensen, soit, plus tard, suivant celui proposé par K. A. Hasselbalch[3]). Quelquefois, la concentration ionique fut déterminée dans le liquide filtré, soit par électrométrie, soit par colorimétrie, le p-nitrophénol ou le rouge de méthyle[4]) servant d'indicateur.

Les mesures électrométriques montrèrent que le résultat est le même qu'elles aient été faites dans la liqueur filtrée ou directement dans la bouillie. Quant aux mesures colorimétriques, elles concordent bien avec celles-là dans les échantillons addi-

[1]) A l'endroit cité.

[2]) Etant donné que dans la pâte destinée à la cuisson le rapport farine: liquide a été en moyenne et sans grands écarts 1100 : 650, et que le rapport farine: liquide dans la pâte «étendue» est constamment 1 : 4, il s'ensuit que la concentration ionique a été mesurée dans une pâte étendue dans la proportion 4400 : 650 = 6,77.

[3]) Ces mêmes Comptes-rendus, **10**, 69 (1911).

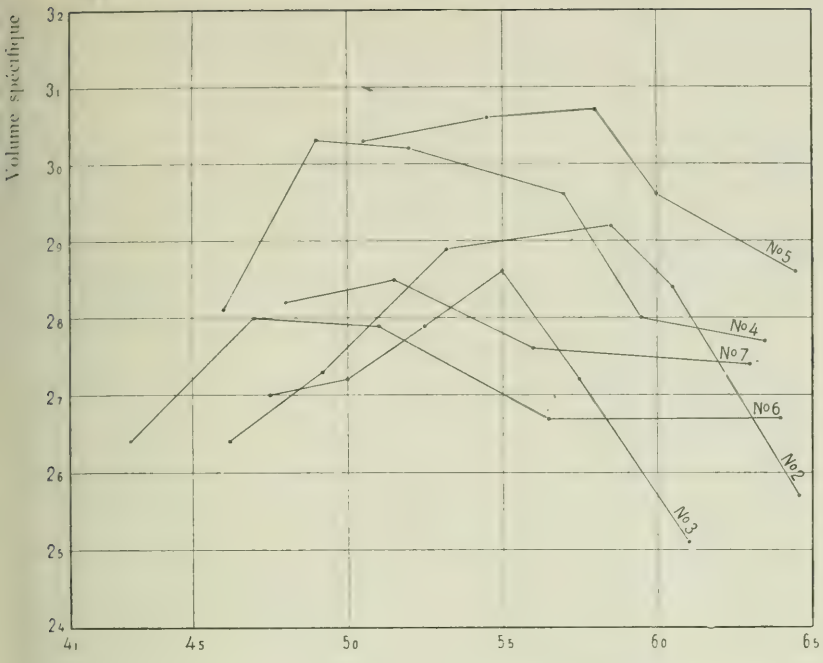
[4]) *Ibid.*, **10**. 162 (1911).

Tableau I.

N°	Provenance de la farine	N en % de la matière sèche	Matière sèche en %								Augment. du vol. spécifique, en %
2	Taganrog	2,991	84,73	Nombre d'équivalents-milligr. d'acide ajoutés à 1 kgr. de farine	0	21,8	29,0	50,8	65,3	78,3	85,1	—
				p_H^+	6,46	6,05	**5,85**	5,32	4,92	4,62	—	—
				Volume spécifique	2,57	2,84	**2,92**	2,89	2,73	2,64	2,60	13,6
				Rendement	1,56	1,58	1,59	1,57	1,57	1,58	1,56	—
3	Suède	2,132	83,59	Nombre d'équivalents-milligr. d'acide ajoutés à 1 kgr. de farine	0	1,41	21,2	28,2	35,3	42,3	—	—
				p_H^+	6,20	5,75	**5,50**	5,25	—	—	—	—
				Volume spécifique	2,51	2,72	**2,86**	2,79	2,72	2,70	—	13,9
				Rendement	1,59	1,60	1,58	1,59	1,57	1,58	—	—
4	Riga	2,620	87,37	Nombre d'équivalents-milligr. d'acide ajoutés à 1 kgr. de farine	0	10,7	21,3	32,0	42,6	53,3	—	—
				p_H^+	6,35	5,95	5,70	5,20	**4,90**	4,60	—	—
				Volume spécifique	2,77	2,80	2,96	3,02	**3,03**	2,81	—	9,4
				Rendement	1,52	1,53	1,52	1,52	1,52	1,54	—	—
5	Indes orientales	2,000	87,03	Nombre d'équivalents-milligr. d'acide ajoutés à 1 kgr. de farine	0	16,2	24,3	36,5	48,6	—	—	—
				p_H^+	6,45	6,00	**5,80**	5,45	5,05	—	—	—
				Volume spécifique	2,86	2,96	**3,07**	3,06	3,03	—	—	7,3
				Rendement	1,53	1,57	1,57	1,55	1,54	—	—	—
6	Océanie	2,250	86,03	Nombre d'équivalents-milligr. d'acide ajoutés à 1 kgr. de farine	0	23,3	34,9	46,5	58,1	—	—	—
				p_H^+	6,40	5,65	5,10	**4,70**	4,30	—	—	—
				Volume spécifique	2,67	2,67	2,79	**2,80**	2,64	—	—	4,9
				Rendement	1,57	1,56	1,54	1,55	1,55	—	—	—
7	Mélange	2,508	85,12	Nombre d'équivalents-milligr. d'acide ajoutés à 1 kgr. du farine	0	23,1	34,7	40,0	46,2	—	—	—
				p_H^+	6,30	5,60	**5,15**	4,90	4,80	—	—	—
				Volume spécifique	2,74	2,76	**2,85**	2,70	2,82	—	—	4,0
				Rendement	1,58	1,59	1,58	1,57	1,59	—	—	—

tionnés de peu ou point d'acide, tandis que la concordance est moins bonne dans tous les cas où l'on a employé une plus forte dose d'acide, c'est-à-dire où l'exposant des ions hydrogène se rapproche de 5 ou est inférieur à ce chiffre. Ceci tient sûrement à ce que dans ce cas-ci une plus forte proportion de protéine entre en dissolution, ce qui a pour effet de rendre moins

Figure I.



Exposant des ions hydrogène: p_H^+.

sûrs la plupart des indicateurs[1]), comme aussi de rendre plus difficile la filtration, au point qu'on a grand'peine à obtenir des filtrats suffisamment limpides.

B. Résultats expérimentaux.

Ayant examiné de la manière décrite ci-dessus 16 farines différentes toutes relativement fraiches moulues, et d'autre part 4 acides, j'ai constaté que par addition d'un acide toutes les farines sont influencées de la façon indiquée, bien qu'à des degrés très différents. J'ai établi en outre, que, pour une même concentration en ions hydrogène, l'action des divers acides ne présente pas de différence sensible. L'acide sur lequel ont porté le plus grand nombre d'essais est l'acide chlorhydrique; mais à côté de lui on a recherché l'action des acides acétique, lactique et phosphorique, — ce dernier parce qu'il fait partie de toute farine, et l'acide lactique parce qu'il est censé du moins se trouver dans la farine vieille.

Les résultats auxquels je suis arrivé se trouvent réunis dans

[1]) S. P. L. Sørensen, à l'endroit cité.

Tableau II.

N° de la farine	Matières sèches en %	N en % de la matière sèche	Acide employé								Augmentat. du vol spécifique, en %
1	83,75	2,387	chlorhydrique	Nombre d'équivalents mgr. d'acide ajouté à 1 kgr. de farine	0	6,6	13,0	17,9	24,7	31,2	39,0	—
				P_H^+	6,25	5,75	5,45	5,00	**4,60**	4,25	—	—
				Volume spécifique	2,44	2,80	2,85	3,06	**3,34**	3,18	3,02	36,9
				Rendement	1,56	1,57	1,56	1,53	1,51	1,51	1,51	—
8	83,94	1,962	chlorhydrique	Nombre d'équivalents mgr. d'acide ajouté à 1 kgr. de farine	0	6,8	16,3	20,4	24,5	29,9	—	—
				P_H^+	6,10	5,75	5,15	5,00	**4,85**	4,65	—	—
				Volume spécifique	2,98	2,97	3,14	3,18	**3,20**	3,13	—	7,4
				Rendement	1,55	1,56	1,55	1,56	1,55	1,56	—	—
10	85,40	1,985	chlorhydrique	Nombre d'équivalents mgr. d'acide ajouté à 1 kgr. de farine	0	10,0	20,0	26,8	33,5	—	—	—
				P_H^+	6,10	5,40	4,95	**4,44**	4,31	—	—	—
				Volume spécifique	2,90	3,08	3,10	**3,11**	2,94	—	—	7,2
				Rendement	1,51	1,50	1,52	1,47	1,52	—	—	—
11	84,28	2,079	chlorhydrique	Nombre d'équivalents mgr. d'acide ajouté à 1 kgr. de farine	0	14,2	21,3	28,4	35,5	—	—	—
				P_H^+	6,10	5,05	**4,65**	4,30	4,00	—	—	—
				Volume spécifique	3,10	3,20	**3,33**	3,27	3,19	—	—	7,4
				Rendement	1,60	1,61	1,59	1,58	1,58	—	—	—
11			phosphorique	Nombre d'équivalents mgr. d'acide ajouté à 1 kgr. de farine	—	22,3	33,2	44,3	55,3	71,9	88,5	—
				P_H^+	—	5,40	5,20	5,00	**4,75**	4,45	4,24	—
				Volume spécifique	3,10	3,27	3,35	3,37	**3,47**	3,38	3,17	11,9
				Rendement	—	1,61	1,60	1,59	1,59	1,61	1,60	—
12	83,56	2,058	chlorhydrique	Nombre d'équivalents mgr. d'acide ajouté à 1 kgr. de farine	0	13,8	17,3	20,7	27,6	—	—	—
				P_H^+	6,10	5,95	**4,85**	4,70	4,40	—	—	—
				Volume spécifique	3,27	3,47	**3,56**	3,46	3,39	—	—	8,9
				Rendement	1,55	1,53	1,52	1,56	1,56	—	—	—
12	85,03		acétique	Nombre d'équivalents mgr. d'acide ajouté à 1 kgr. de farine	0	13,6	27,2	40,8	—	—	—	—
				P_H^+	5,90	5,15	**4,75**	4,60	—	—	—	—
				Volume spécifique	3,38	3,51	**3,52**	3,51	—	—	—	4,1
				Rendement	1,51	1,53	1,53	1,54	—	—	—	—
12	85,49	1,758	lactique	Nombre d'équivalents mgr. d'acide ajouté à 1 kgr. de farine	0	7,3	14,5	21,8	29,0	—	—	—
				P_H^+	6,05	5,45	**5,05**	4,65	4,45	—	—	—
				Volume spécifique	3,74	3,78	**3,91**	3,87	3,76	—	—	4,5
				Note	7,70	7,83	7,85	7,85	7,65	—	—	—

Figure II.

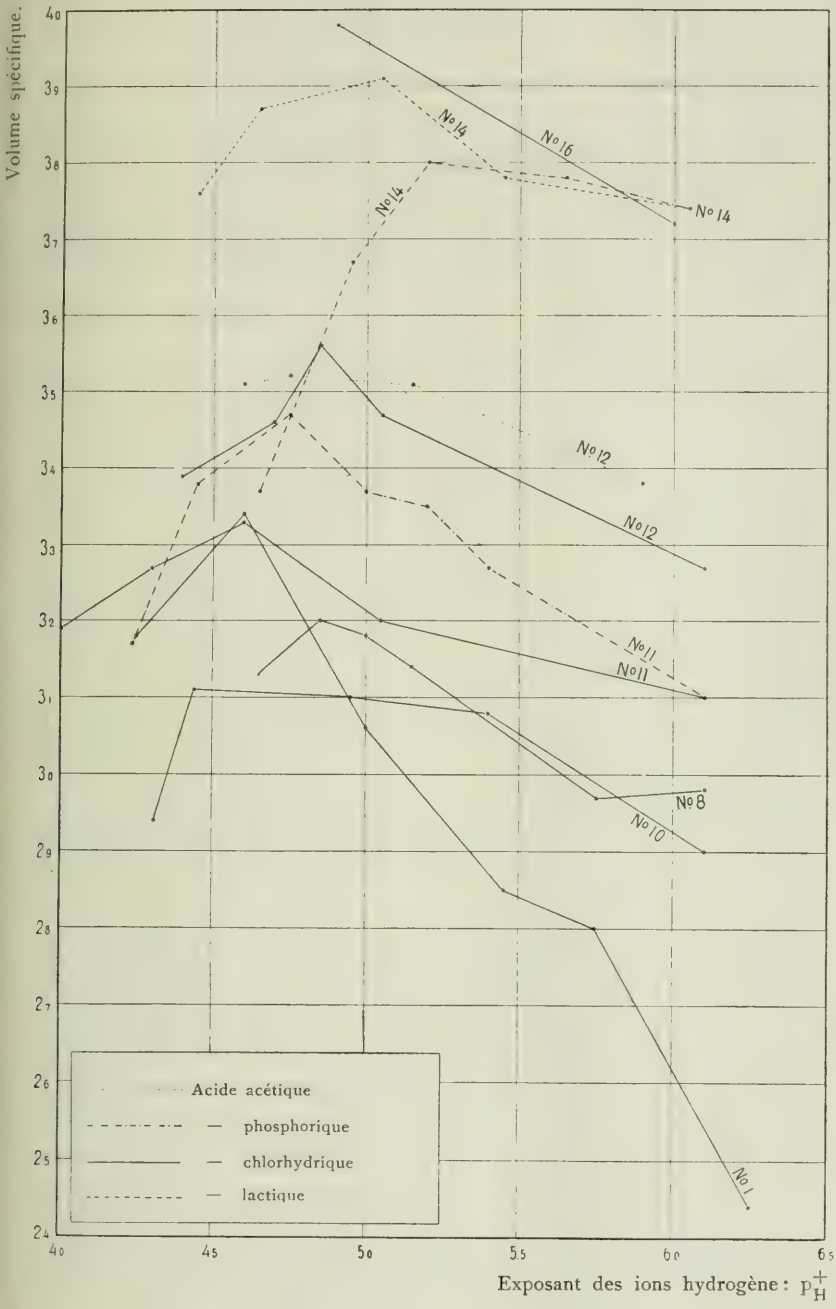

Volume spécifique.
40
39
38
37
36
35
34
33
32
31
30
29
28
27
26
25
24
40
45
50
55
60
65
Exposant des ions hydrogène : p_H^+
N° 16
N° 14
N° 14
N° 14
N° 12
N° 12
N° 11
N° 11
N° 8
N° 10
N° 1
Acide acétique
phosphorique
chlorhydrique
lactique

Tableau II. (Suite).

N° de la farine	Matière sèche en %	N en % de la matière sèche	Acide employé								Augment. du vol. spécifique, en %
14	88,46	1,758	phosphorique	Nombre d'équivalents-mgr. d'acide ajouté à 1 kgr. de farine .	—	17,2	34,3	51,5	68,6	—	—	—	
				p_H^+	—	5,65	**5,20**	4,95	4,65	—	—	—	
				Volume spécifique . .	3,74	3,78	**3,80**	3,67	3,37	—	—	—	1,6
				Note	—	7,78	7,85	7,90	7,38	—	—	—	
16	89,57	1,775	chlorhydrique	Nombre d'équivalents-mgr. d'acide ajouté à 1 kgr. de farine .	0	15,8	—	—	—	—	—	—	
				p_H^+	6,00	4,90	—	—	—	—	—	—	
				Volume spécifique . .	3,72	3,98	—	—	—	—	—	—	7,0
				Note	7,67	8,00	—	—	—	—	—	—	

les tableaux I—III, et les figures I—III les représentent graphiquement.

Le tableau I et la figure I se rapportent à des essais faits sur des farines du genre de celles qu'en pratique on appelle «farine à 70 pour cent» (nommées en Amérique «straight»). Dans tous ces essais on a toujours employé l'acide chlorhydrique. Les farines ont été préparées avec cinq sortes de froment d'espèce et d'origine très diverses et, d'autre part, avec un mélange de ces froments. Nous avons dû renoncer à trier la farine fournie par chacun des froments, n'ayant pas eu à notre disposition aucun appareil qui nous ait permis d'effectuer ce triage en moulant de petites quantités de blé.

Les essais consignés dans le tableau et la figure II ont été effectués sur des échantillons de farines de la meilleure qualité que puisse fournir l'industrie meunière et qui se trouvent dans le commerce sous des dénominations comme par ex. «Patent» (Breveté), farines qui le plus souvent ne représentent qu'environ 30 % du poids du froment (le pourcentage peut quelquefois atteindre 50 %). Dans ces essais on a fait usage non seulement de l'acide chlorhydrique, mais aussi des trois autres acides susnommés.

Le tableau III ainsi que la figure III, contrairement au tableau précédent, rassemblent les résultats d'essais portant sur les farines les plus ordinaires qui soient dans le commerce dans ce pays et qui sont vendues sous le nom de «Flormel» *etc.* Elles sont

constituées par le reste que peut fournir le froment au delà des 30—50 % de farine de premier ordre. En outre, on trouve ici, sous le n° 15, les résultats d'une suite d'essais faits sur un mélange de farine utilisé dans une boulangerie de Copenhague et composé de deux parties de farine appartenant plutôt à cette classe et de 1 partie d'une farine américaine plus fine (Herald).

En ce qui concerne le contenu des tableaux, les trois ou quatre premières colonnes verticales se comprennent sans autre; afin de faciliter la compréhension des autres colonnes, qui en sont les parties les plus essentielles, nous allons donner les explications suivantes.

Ainsi qu'on le verra, nous avons réuni les séries horizontales de chiffres en groupes de quatre, un groupe pour chaque sorte de farine, de façon que les quatre chiffres d'une même colonne se rapportent à un seul essai. Dans la première série de chaque groupe se trouve indiquée en équivalents-milligrammes la dose d'acide employée pour chaque kilogramme de farine. La série suivante comprend les exposants des ions hydrogène p_H^+, déterminés dans la pâte «étendue», c'est-à-dire les valeurs qui sur la figure correspondante ont été portées en abscisses. Dans la troisième série figurent les volumes spécifiques observés dans les pains, donc le volume de 1 gr. de pain en centimètres cubes ou celui de 1 kgr. de pain en litres; sur les figures ces chiffres sont portés en ordonnées. Les chiffres en caractères gras des deuxièmes et troisièmes séries sont les valeurs optimales observées. Dans les quelques cas où la valeur du volume spécifique dans la première colonne verticale a été mise entre parenthèses, on n'a pas fait d'essais sans addition d'acide, et ces valeurs-là ont été prises dans la série qui se trouve au-dessus.

Enfin, les quatrièmes séries indiquent, pour les premières séries expérimentales, le rendement, c'est-à-dire la quantité de pain obtenue. dans l'essai particulier, de 1 partie de matière sèche de farine. La matière sèche se détermine toujours en séchant la farine dans le vide à 80° pendant 16 heures. Dans les dernières séries d'expériences nous avons donné à la place du rendement un chiffre destiné à caractériser d'une manière générale la valeur boulangère de la farine (abstraction faite du volume spécifique) et désigné par le terme «note», pris dans le même sens que lorsqu'il sert à caractériser le résultat d'un examen.

En effet, d'un côté, les chiffres figurant dans les tableaux,

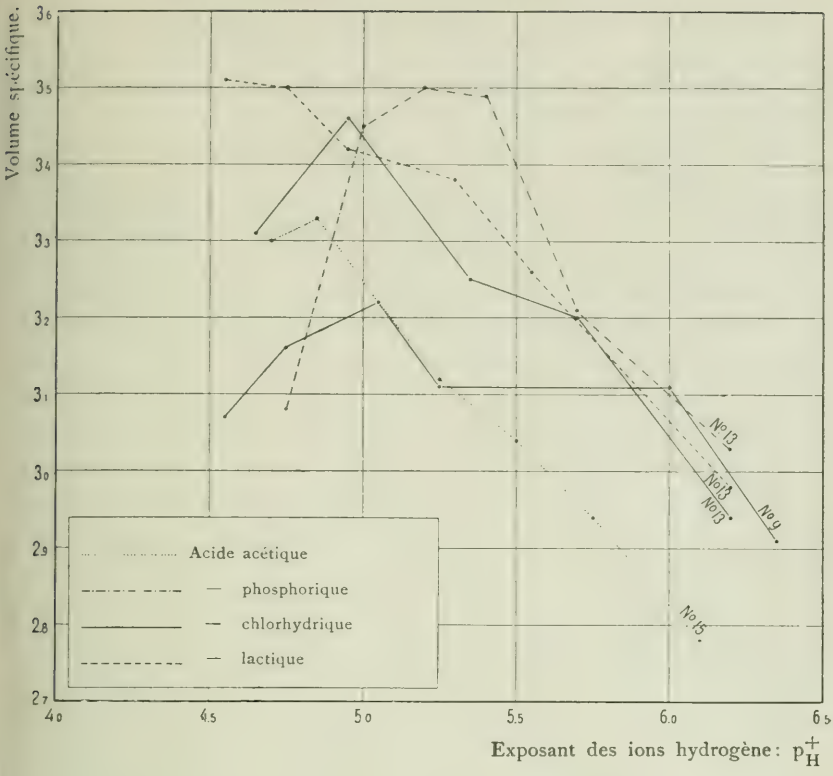
Tableau III.

N° de la farine	Matière sèche en %	N en % de la matière sèche	Acide employé								Augment. du vol. spécifique, en %
0	84,94	2,133	chlorhydrique	Nombre d'équivalents-mgr. d'acide ajoutés à 1 kgr. de farine	0	9,4	20,1	26,8	33,5	40,2	—	—
				p_H^+	6,35	6,00	5,25	**5,05**	4,75	4,55	—	—
				Volume spécifique	2,91	3,11	3,11	**3,22**	3,16	3,07	—	10,7
				Rendement	1,53	1,51	1,54	1,53	1,51	1,52	—	—
13	86,48	2,069	chlorhydrique	Nombre d'équivalents-mgr. d'acide ajoutés à 1 kgr. de farine	0	13,7	20,6	27,4	34,3	—	—	—
				p_H^+	6,20	5,70	5,35	**4,95**	4,65	—	—	—
				Volume spécifique	2,94	3,20	3,25	**3,46**	3,31	—	—	17,7
				Note	5,75	6,59	6,67	6,75	6,50	—	—	—
13	»	»	phosphorique	Nombre d'équivalents-mgr. d'acide ajoutés à 1 kgr. de farine	0	32,2	48,3	64,4	80,4	96,5	—	—
				p_H^+	6,20	5,70	5,40	**5,20**	5,00	4,75	—	—
				Volume spécifique	3,03	3,21	3,49	**3,50**	3,45	3,08	—	15,5
				Note	6,35	6,75	7,17	7,30	7,23	6,95	—	—
13	»	»	lactique	Nombre d'équivalents-mgr. d'acide ajoutés à 1 kgr. de farine	—	14,1	21,2	28,2	35,3	42,3	—	—
				p_H^+	—	5,55	5,30	4,95	4,75	**4,55**	—	—
				Volume spécifique	(2,98)	3,26	3,38	3,42	3,50	**3,51**	—	17,8
				Note	—	6,85	7,18	7,28	7,48	7,35	—	—
15	90,05	2,108	acétique	Nombre d'équivalents-mgr. d'acide ajoutés à 1 kgr. de farine	0	7,3	14,6	21,9	29,2	40,2	51,1	—
				p_H^+	6,10	—	5,50	—	5,05	**4,85**	4,70	—
				Volume spécifique	2,78	2,94	3,04	3,12	3,22	**3,33**	3,30	19,8
				Note	6,19	6,94	6,94	7,19	7,31	7,62	7,69	—

comme aussi les résultats de nos autres essais, établissent que le rendement n'est pas influencé par l'acide ajouté[1]), — et, d'autre part, — comme nous l'avons déjà fait remarquer, — non seulement le volume spécifique, mais aussi les autres propriétés du pain en sont favorablement influencées. Nous avons donc voulu essayer s'il était possible de rendre aussi en chiffres cet effet de l'addition d'acide, en imaginant un système de notes.

[1]) Toutefois, une série fait exception, à savoir celle qui figure dans le n° 1 du tableau II, où il semble qu'une influence régulière se soit manifestée; cependant, ne s'étant pas renouvelée, elle doit plutôt être regardée comme étant accidentelle.

Figure III.



Dans ce but nous avons assigné une valeur numérique aux diverses propriétés susceptibles d'une appréciation de ce genre, puis nous avons additionné ces valeurs et divisé le total par le nombre des notes, ce qui a donné la note définitive.

Les propriétés dont le chiffre indiqué était destiné à représenter l'ensemble, sont au nombre de cinq, à savoir:

1° la forme et l'aspect extérieur du pain en général, abstraction faite de la teinte;

2° la couleur de la croûte;

3° la finesse et l'homogénéité de la texture ou porosité;

4° la couleur de la mie, — et

5° la facilité plus ou moins grande avec laquelle la pâte se laissait travailler[1]).

[1]) En outre des propriétés énumérées plus haut, il pourrait encore être question de donner des notes à deux autres, à savoir à l'odeur et au goût du pain; mais les différences qui s'y font remarquer étaient si minimes que

En conséquence, nous avons procédé de la manière suivante: Partant du parfait de tout point, nous l'avons posé = 8, et selon que nous estimions qu'un pain était plus ou moins éloigné de cette perfection, nous avons diminué la note en proportion. Les quatre pains d'une fournee furent jugés en bloc et reçurent ainsi une note commune pour chacune des cinq propriétés susnommées. Etant donné que pour chacun des essais nous avons généralement fait trois fournees, il s'ensuit que les chiffres consignés dans les tableaux représentent les moyennes de quinze notes spéciales, et conséquemment ils peuvent, croyons-nous, être considérés comme equivalant d'une façon très approchée au rapport existant entre les valeurs des pains, en tout cas de ceux appartenant à une même série expérimentale, et cela d'autant plus que toutes ces propriétés vont, en genéral, de pair et qu'un amoindrissement de l'une d'elles n'est pas compensé par une amélioration d'une autre. C'est pourquoi il me paraît être juste de donner la note avec deux décimales, bien qu'au premier abord cela puisse paraître quelque peu osé.

Par contre, pour ce qui est de comparer entre elles les valeurs appartenant à des séries différentes, il convient d'être bien plus prudent — à cet égard comme à d'autres, d'ailleurs —, attendu que ces valeurs ne se rapportent pas à des notes données simultanément. Mais par ailleurs c'est ici la comparaison des pains faits avec une même farine qui présente le plus grand intérêt.

Comme l'application de ce système ne s'est perfectionné qu'à la longue, nous n'avons donné que les résultats des dernières séries d'essais; au reste, les premières séries eussent sûrement donné un résultat tout à fait semblable, d'accord avec ce fait que c'était elles qui nous amenèrent à faire l'essai du système de notes.

Si maintenant nous passons à un examen plus approfondi des tableaux et des tables de courbes, il suffira d'un coup d'œil, surtout sur ces dernières, pour nous convaincre de l'exactitude de ce qui a été dit dans notre introduction, à savoir que pour chacune des farines examinées il y a un optimum de la concentra-

nous avons cru ne pas avoir à en tenir compte. Quoi qu'il en soit, nous sommes disposé à estimer qu'à ces points de vue aussi l'optimum coïncide avec celui du volume spécifique. En tout cas, la valeur n'en est pas diminuée, et l'acide ne se fait remarquer en tant qu'acide que lorsque sous d'autres rapports aussi il a des effets nocifs.

tion en ions hydrogène, optimum qui détermine le volume spécifique le plus grand, et qu'on n'atteint cet optimum qu'après l'addition d'une plus ou moins forte dose d'acide. Les tableaux démontrent en même temps que cet optimum s'applique aussi aux diverses propriétés caractérisées par la note, et que celle-ci suit, d'une façon générale, une marche parallèle à celle du poids spécifique.

Nous sommes bien ici en présence d'une règle générale, d'autant plus que les tableaux renferment tous les essais faits, sauf quelques séries préliminaires dans lesquelles il m'a fallu procéder en tâtonnant pour trouver les doses d'acide convenables. Du reste, ces essais préliminaires militent, eux aussi, en faveur de la règle que nous venons d'établir. La seule exception que nous avons rencontrée est indiquée par le N° 7 du Tableau I (mélange de farine, essai de la quatrième colonne, $p_H^+ = 4{,}90$); mais cette exception apparente n'en est pas une en réalité parce que, à cause de circonstances accidentelles, l'essai en question n'avait pas été fait en même temps que les autres de la série, mais en un jour à part, ce qui en réalité rend la comparaison illusoire. C'est pourquoi les chiffres relatifs à cet essai ont été mis entre parenthèses et que nous n'en avons pas tenu compte en construisant la courbe correspondante.

On verra en outre, que cet optimum, quoique étant quelque peu différent pour les différentes farines, se trouve dans tous les cas situé au voisinage de l'exposant des ions hydrogène $p_H^+ = 5$ [1]), et qu'il paraît se rattacher à une valeur légèrement plus basse de p_H^+ pour les farines de choix, tandis que pour les sortes ordinaires cette valeur paraît un peu plus élevée.

Quant au rapport existant entre la concentration ionique de la pâte réelle et celle de la pâte «étendue», il me paraît que celle-là doit être la plus grande, sans toutefois qu'il y ait de différence sensible. Quoiqu'il en soit, on ne peut pas dire: la pâte réelle a été étendue dans la proportion 6,5 : 44 (v. p. 177), donc la concentration des ions hydrogène se trouve diminuée dans la même proportion, et l'on arrive à l'exposant des ions hydrogène de la pâte réelle en

[1]) C'est-à-dire une concentration des ions hydrogène légèrement inférieure à celle d'une solution $^m/_{15}$ de phosphate primaire et à peu près égalant celle qui, d'après les recherches de S. P. L. Sørensen et E. Jürgensen, représente l'optimum de la coagulation des matières protéiques. Ces mêmes Comptes-rendus, **10**, 1 (1911).

additionnant le log. 6,5 44 = ÷ 0,83 au p_H^+ de la pâte «étendue». En fait, des essais que j'ai effectués en comparant entre elles les concentrations en ions hydrogène de diverses pâtes étendues dans les proportions 6,5 : 44 et 6,5 : 17,6 (celle-ci étant la plus légère dilution qu'on soit à même de mesurer électrométriquement sans trop de difficulté), ont donné pour résultat que le p_H^+ de ces dernières pâtes était, tout au plus, de 0,1 plus bas que celui des premières, alors que, calculée d'après la dilution, la concentration en ions hydrogène devrait être 2,5 fois plus grande, donc p_H^+ de 0,4 (= log. 2,5) plus petit dans le dernier cas que dans le premier. Ce fait tient probablement à ce que la farine renferme des corps aptes à faire office de «tampons» [1]) (protéines, acides aminés, phosphates, etc.) et, d'autre part, à des conditions de dissociation et d'hydrolyse qui échappent à tout mesurage direct.

D'autre part, la configuration différente des courbes se rapportant aux diverses farines, ainsi que la diversité de leurs optima, font voir que la concentration des ions hydrogène n'est pas le seul facteur qui ait de l'influence sur la valeur boulangère d'une farine: s'il en était ainsi, les courbes devraient coïncider. Toutefois, les divergences rencontrées à cet égard ne sauraient en totalité être mises sur le compte de la farine, parce que les essais de cuisson des farines N° 1 à 10 ont été faits par un boulanger, les autres essais par un autre, fait qui a introduit un élément personnel qu'on ne peut guère négliger. Cependant, si, d'un côté, ce fait constitue un désavantage en ce qu'il rend difficile la comparaison entre les différents essais, il n'en est pas moins vrai que, d'un autre côté, une preuve en plus de l'existence réelle de l'optimum en question est fournie par la circonstance que cet optimum a été constaté non seulement pour des farines diverses et pour des acides divers, mais aussi dans des essais effectués par deux personnes différentes.

En ce qui concerne l'effet produit par les divers acides, il n'y a dans nos essais rien qui indique que leurs optima soient situés à des concentrations en ions hydrogène différentes. Les divergences rencontrées sous ce rapport sont tout naturellement imputables à des erreurs expérimentales.

Parmi mes séries d'essais il y en a deux qui pourraient faire croire que l'anion de l'acide peut aussi jouer un rôle: ce sont celles faites avec l'acide phosphorique ajouté soit à la farine N° 11 fraîchement moulue (Tableau II), soit à la même farine mise de côté pendant un certain temps (nous parlerons plus tard de cette dernière

[1]) S. P. L. Sørensen, à l'endroit cité.

série; v. p. 193, tableau V et fig. IV). Dans ces deux séries, en effet, il semble que l'acide phosphorique ait produit un effet notablement plus grand que celui des acides chlorhydrique ou lactique.

Or, étant donné que, ces dernières années, l'acide phosphorique ou des phosphates acides ont été fréquemment recommandés comme étant aptes à «améliorer» la farine (v. plus loin, p. 198), il y avait lieu d'en faire l'objet d'une recherche spéciale en vue d'établir s'ils pouvaient réellement exercer une influence dépassant celle due aux ions hydrogène. C'est ce qui m'amena à entreprendre sur la farine N° 12 une série d'essais dans laquelle, à l'aide de l'acide chlorhydrique, je préparai des liqueurs qui donnèrent à la pâte la concentration voulue en ions hydrogène et qui furent ensuite additionnées de doses variées d'une solution de phosphates d'alcalis ayant la même concentration en ions hydrogène que la pâte «étendue», de telle façon que cette concentration fut toujours la même, soit que la pâte fût préparée au moyen de la liqueur ne contenant que de l'acide chlorhydrique, soit que les liqueurs employées renfermassent en même temps des phosphates. Les résultats de ces essais se trouvent consignés dans le tableau IV, qui montrera également combien il est important de ne comparer entre eux, autant que possible, que des essais exécutés simultanément.

Comme on le voit, ce tableau est divisé en sections verticales et horizontales. Dans les essais figurant dans une même série horizontale, les pâtes contiennent la même proportion d'anions phosphoriques (notée dans la première colonne verticale), tout en étant de concentrations différentes par rapport aux ions hydrogène. Dans les essais consignés dans une même colonne verticale, la concentration ionique est la même et correspond à l'exposant d'ions hydrogène marqué en tête de cette colonne, tandis que la proportion de phosphates varie. Pour les quantités de phosphates on a pris comme unité la teneur en acide phosphorique de la farine se trouvant à l'état naturel. Donc, dans les séries où la quantité de phosphate est de 1,000, on n'a rien ajouté.

Si les variations ont été faites apparemment aussi faibles, c'est parce qu'elles devaient être sensiblement du même ordre de grandeur que celles qu'on peut s'attendre à rencontrer dans des farines provenant de différentes sortes de froment, tout particulièrement dans leurs parties solubles dans l'eau. J'ai donné le résultat de chaque cuisson en particulier, de même qu'un nombre indiquant la date de celle-ci, et j'ai calculé la moyenne sur des groupes de trois cuissons comme à l'ordinaire.

Un examen plus approfondi du tableau IV montre que l'addition de phosphates n'a pas produit d'effet dans ce cas, ou, s'il y en a eu, il n'a pas été favorable. A la vérité, malgré ces résultats, il se peut que dans d'autres cas les ions phosphate puissent exercer une influence favorable; mais, quoiqu'il en soit, leur influence ne pourra jamais être d'une nature aussi générale que celle des ions hydrogène.

La comparaison des essais effectués en des jours différents, mais par ailleurs dans des conditions pareilles, montrera également la nécessité de ne comparer entre eux, autant que possible, que des essais simultanés.

Tableau IV.

La matière sèche de la farine contenait 2,39 ‰ d'acide phosphorique en tout, dont 0,75 ‰ était soluble dans l'eau.

p_H^+ =	6,09		5,04		4,87		4,70		4,40	
Acide phosphorique.	Jour.	Volume spécifique	Jour.	Volume spécifique	Jour.	Volume spécifique	Jour.	Volume spécifique.	Jour.	Volume spécifique.
	13	3,233	13	3,513	16	3,735	13	3,541	13	3,456
	14	3,315	14	3,518	17	3,483	14	3,410	14	3,380
	15	3,251	15	3,380	18	3,471	15	3,433	15	3,328
		3,266		3,470		3,563		3,461		3,388
	20	3,515	24	3,506	29	3,531	1	3,643	—	—
	22	3,465	25	3,551	30	3,666	3	3,557	—	—
1,000	23	3,558	27	3,425	31	3,736	4	3,522	—	—
		3,513		3,461		3,644		3,574		—
	28	3,340	—	—	—	—	—	—	—	—
	30	3,417	—	—	—	—	—	—	—	—
	31	3,443	—	—	—	—	—	—	—	—
		3,400		—		—		—		—
	20	3,477	24	3,557	29	3,400	1	3,817	—	—
	22	3,507	25	3,496	30	3,755	3	3,607	—	—
1,014	23	3,676	27	3,325	5	3,533	4	3,574	—	—
		3,553		3,459		3,563		3,666		—
	20	3,520	24	3,477	29	3,396	1	3,602	—	—
	22	3,509	25	3,450	30	3,647	3	3,546	—	—
1,035	23	3,402	27	3,282	31	3,680	4	3,629	—	—
		3,477		3,403		3,574		3,592		—
	16	3,426	—	—	—	—	—	—	—	—
	17	3,387	—	—	—	—	—	—	—	—
1,070	18	3,411	—	—	—	—	—	—	—	—
		3,408		—		—		—		—
	20	3,530	24	3,471	29	3,311	1	3,745	—	—
	22	3,463	25	3,421	31	3,679	3	3,557	—	—
1,14	23	3,545	27	3,339	5	3,556	4	3,479	—	—
		3,513		3,410		3,515		3,592		—
	16	3,384	—	—	—	—	—	—	—	—
	17	3,315	—	—	—	—	—	—	—	—
1,28	18	3,351	—	—	—	—	—	—	—	—
		3,350		—		—		—		—
	16	3,441	—	—	—	—	—	—	—	—
	17	3,411	—	—	—	—	—	—	—	—
2,00	18	3,308	—	—	—	—	—	—	—	—
		3,353		—		—		—		—

C. Conclusions.

1. Sur la conservation de la farine.

On pourrait objecter que les constatations que nous venons d'exposer n'offrent qu'un intérêt secondaire; car si dans la farine naturelle, ou plus exactement dans les pâtes qui en sont faites, il n'existe pas d'autres concentrations en ions hydrogène que celles correspondant à un exposant d'ions hydrogène allant de $p_H^+ = 6{,}5$ à $p_H^+ = 6{,}0$ — et c'est entre ces limites étroites que se trouvent comprises lesdites concentrations des farines que j'ai examinées, hormis une seule exception, sur laquelle je reviendrai plus tard (v. p. 192) —, il est évident que nous ne sommes pas encore parvenus à résoudre la question qui seule a de l'intérêt technique, c'est-à-dire celle de savoir ce qui peut bien déterminer les différences de la valeur boulangère des différentes sortes de farine. Bien que nous admettions que nous n'avons point épuisé le sujet et que nous avons peut-être à peine touché le fond même de la question, nous aimons à croire que les résultats obtenus n'en laissent pas moins que de présenter un certain intérêt.

En fait, comme nous l'avons fait remarquer, tous les échantillons de farine considérés étaient fraîchement moulus, ou à peu près. Or, c'est un fait connu que la farine se bonifie avec le temps, fait dont nombre de chercheurs ont vainement recherché la cause[1]). On sait en outre, que la farine s'aigrit à la longue[2]), sans cependant en savoir bien exactement la raison, qu'on a cru trouver dans une oxydation de l'une ou l'autre des substances qui font partie de la farine, tandis que d'autres savants — et entre ceux-ci A. Kossowicz[3]), qui toutefois ne fournit pas de preuves à l'appui de sa manière de voir — ont invoqué une action bactérienne. On ne sait pas non plus avec certitude quels sont les constituants de la farine qui donnent naissance à l'acide; il semble que Aimé Girard[4]) ait raison en émettant l'avis que ce sont les matières grasses qui subissent l'oxydation. Quoiqu'il en soit, il est certain — et mes propres essais m'ont permis de le vérifier — qu'une conservation prolongée fait diminuer la pro-

[1]) Voir p. ex. M. P. Neumann, Zeitschr. für das ges. Getreidewesen **1**, 289 (1909), et **3**, 83 (1911).

[2]) Voir, entre autres, Balland, Journ. de pharm. [5] **8**, 387 (1883).

[3]) Einführung in die Mykologie der Nahrungsgewerbe. Berlin 1911, p. 104.

[4]) Ann. de chimie et de pharm. [6] **3**, 289 (1884).

portion de ces matières et qu'en même temps la farine devient très aigre.

Enfin on sait aussi qu'une farine de froment qui a été moulue trop longtemps d'avance peut devenir même excessivement aigre et, de ce fait, impropre à la panification, bien que, dans ce cas, elle se prête on ne peut mieux à être mélangée à de la farine fraîche qui serait trop «faible» et qui, grâce à ce mélange, acquiert la «force» requise[1]). Dans la pâte «étendue» provenant de petits échantillons de farine qui avaient été conservés assez longtemps dans des conditions nullement défavorables, j'ai observé une concentration ionique correspondant à une valeur de p_H^+ égale à environ 4, donc une acidité de beaucoup plus forte que celles répondant à n'importe lequel des optima trouvés.

Vu ces faits, les résultats auxquels nous sommes arrivés pourraient faire naître l'idée que l'effet essentiel de la conservation de la farine consiste en ce que, en aigrissant, elle se rapproche de l'état où elle communiquera à la pâte la concentration ionique optimale, état qu'elle finira par atteindre et même dépasser. Cependant cette conclusion n'en est pas moins prématurée. A la vérité, parmi les essais dont les résultats sont consignés dans le tableau II, il y en a un qui milite en sa faveur: j'ai cité le premier essai de la série portant sur la farine N° 12 additionnée d'acide acétique. Cette série d'essais a été effectuée lorsque la farine était vieille d'un mois environ, et en comparant cet essai-là avec le premier essai de la série à l'acide chlorhydrique, laquelle était instituée lorsque la farine était fraîche, on s'apercevra que la concentration des ions hydrogène de la pâte non additionnée d'acide est accrue avec l'âge de la farine, la valeur de p_H^+ s'étant abaissée de 6,10 à 5,90 et le volume spécifique ayant augmenté en même temps. Mais un essai isolé ne permet guère de tirer de conclusions certaines, d'autant moins que la différence constatée entre les deux valeurs est relativement insignifiante.

D'ailleurs, au tableau II on voit encore trois autres séries d'essais sur des farines un peu plus vieilles, à savoir ceux qui portent sur les farines N°s 14 et 16. Leur âge ne m'est pas

[1]) Voir p. ex. Report of the Homegrown Wheat Committee for the fifth Season 1905—06, delivered at a meeting held in Guildhall, Windsor, on July 12, 1906, p. 6—7. Discussion.

connu; mais elles étaient vieilles d'au moins un mois, étant donné qu'on les avait fait venir d'Angleterre et qu'elles avaient été assez longtemps en route; on ne sait rien de positif au sujet de leur âge lors de l'expédition. On remarquera que ce sont ces farines-là qui possèdent la plus grande valeur boulangère, c'est-à-dire que ce sont les pains faits avec elles qui ont présenté le plus grand volume spécifique, et qui, ainsi que le démontrent les notes données, pour tous les autres points aussi ont été très près d'être parfaits. Il est donc à présumer qu'ici la conservation a produit son effet; en outre, l'un des deux échantillons, le N° 14, avait sûrement été «amélioré» par addition de vieille farine aigre (v. p. 192). Effectivement, nous y avons rencontré par hasard un grumeau de farine qui avait une tout autre couleur que le reste et qui était très fortement acide. Néanmoins, dans la pâte faite sans addition d'acide, la concentration des ions hydrogène n'avait pas dépassé $p_H^+ = 6{,}00$ et, par conséquent, l'addition d'acide a encore ici exercé une action indubitablement favorable, bien que dans la série faite avec l'acide phosphorique elle ait été insignifiante.

Dans le but d'approfondir quelque peu l'influence exercée par la conservation de la farine, nous avons entrepris des essais de cuisson sur quelques-uns des échantillons expérimentés précédemment (N°s 8, 9, 10, et 11), après les avoir conservés pendant quelque temps. Les résultats se trouvent réunis dans le tableau V et la figure IV.

Ainsi qu'on le voit par le tableau, surtout en comparant ces résultats avec ceux obtenus avec les farines fraîches et consignés dans les tableaux II et III, on n'a cependant guère réussi à élucider la question. A la vérité, ces essais montrent que tous les échantillons sont devenus un peu plus aigres, et que l'un d'eux: le N° 8, l'est devenu d'une façon très prononcée. Mais ce n'est que dans le cas du N° 11 qu'il paraît être question d'une amélioration. Dans cet échantillon elle est même notablement plus marquée que celle qui correspondrait à la modification subie par la concentration des ions hydrogène; toutefois, vu que dans ce cas les essais sur l'ancienne farine ont été faits avec le concours d'un autre boulanger que celui qui avait cuit la farine fraîche, il s'ensuit que la comparaison n'a que peu ou pas de valeur. — Les essais semblent en quelque sorte montrer que l'effet produit par l'acide ajouté s'affaiblit avec le temps, puisque l'optimum paraît être un peu moins marqué. Quant à l'influence préjudiciable exercée, d'après la courbe se rapportant à la farine N° 8, par une faible dose d'acide, elle doit sûrement être imputée aux erreurs expérimentales.

Afin de pouvoir énoncer quelque chose de positif au sujet des effets de la conservation, il serait indispensable d'effectuer, en divers sens, des expériences bien plus étendues. Les circonstances ne s'y sont pas prêtées jusqu'ici; mais j'espère qu'il me sera donné plus

Tableau V.

N° de la farine.	Temps de conservation	Acide employé.							Valeurs trouvées avant la conservation et sans addition d'acide.
8	8 semaines	chlorhydrique	Nombre d'équivalents-milligr. d'acide ajouté à 1 kgr. de farine	0	14,8	22,2	26,6	—	—	—
			p_H^+	5,75	5,00	4,85	**4,75**	—	—	6,10
			Volume spécifique	2,88	2,80	2,90	**2,94**	—	—	2,98
9	8 —	chlorhydrique	Nombre d'équivalents-milligr. d'acide ajouté à 1 kgr. de farine	0	10,5	22,5	30,0	—	—	—
			p_H^+	6,10	**5,50**	5,05	4,75	—	—	6,35
			Volume spécifique	2,71	**3,02**	2,97	2,92	—	—	2,91
10	6 —	chlorhydrique	Nombre d'équivalents-milligr. d'acide ajouté à 1 kgr. de farine	0	10,2	21,9	29,2	—	—	—
			p_H^+	6,00	**5,40**	(4,95)	(4,45)	—	—	6,10
			Volume spécifique	2,99	**3,04**	2,95	2,96	—	—	2,90
11	14 —	lactique	Nombre d'équivalents-milligr. d'acide ajouté à 1 kgr. de farine	0	6,9	13,8	20,6	—	—	—
			p_H^+	6,00	5,45	**5,00**	4,65	—	—	6,10
			Volume spécifique	3,46	3,53	**3,59**	3,54	—	—	3,10
11	14 —	phosphorique	Nombre d'équivalents-milligr. d'acide ajouté à 1 kgr. de farine	—	15,9	32,3	43,1	53,9	70,1	—
			p_H^+	—	**5,45**	5,10	4,80	4,65	4,35	—
			Volume spécifique	(3,46)	**3,67**	3,66	3,61	3,47	3,37	—

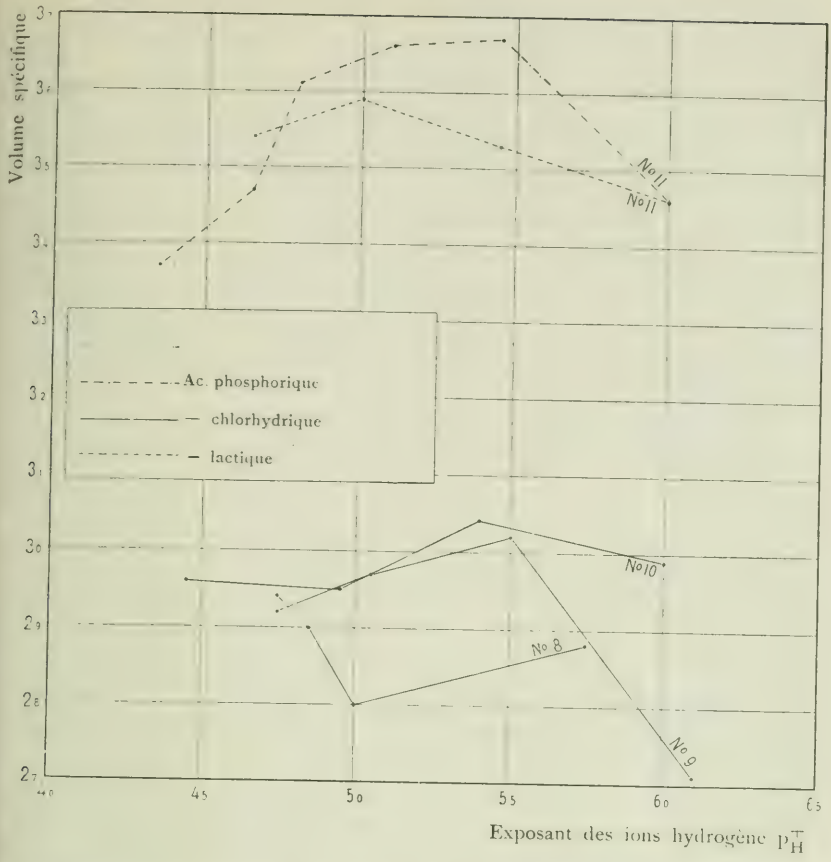
tard de réaliser des essais ultérieurs et plus approfondis, en vue desquels j'ai déjà fait des travaux préparatoires. Si j'ai cru devoir incorporer dans le présent mémoire les essais plutôt préliminaires dont on vient de lire l'exposé sommaire, c'est pour être complet et, d'autre part, pour obvier à des conclusions prématurées.

2. Moyens «artificiels» d'améliorer la farine.

Bien que les résultats que nous avons obtenus n'aient pas répondu d'une façon complète à la question relative aux phénomènes ayant lieu pendant la conservation de la farine de froment, ils n'en ont pas moins, à mon avis, résolu dans ses grandes lignes un autre problème intéressant grandement les meuniers et les boulangers.

On sait assez que, en tout cas autrefois, on s'est appliqué à «améliorer» de la farine qui pour une raison quelconque ne répondait pas aux exigences, en ayant recours à divers procédés

Figure IV.



plus ou moins louches, notamment par l'addition d'alun ou même de sulfate de cuivre[1]), quelquefois de sulfate de zinc[2]). Cependant, comme ces additions ont de tout temps, et à juste titre, été regardées comme des falsifications, il est tout naturel qu'il n'y ait pour ainsi dire personne qui paraisse savoir exactement dans quels cas on en a fait usage. Je n'ai pas été à même de mettre la main sur aucun ouvrage de Kuhlmann, d'Accum ou de Mitchells qui, d'après Péligot[3]) et v. Bibra[4]), se sont occupés spécialement de cette question.

v. Bibra[5]) s'exprime ainsi: «Wenn Mehl feucht geworden, bisweilen auch aus anderen Ursachen, zersetzt sich der Kleber mehr oder weniger, und verliert die Eigenschaft, den Teig bin-

[1]) v. Bibra, Die Getreidearten und das Brot. Nürnberg 1860, p. 388, et Péligot, Traité de chimie analytique appliquée à l'agriculture. 1883, p. 394.
[2]) Péligot, *loc. cit.* [3]) *loc. cit.* [4]) *loc. cit.* [5]) *loc. cit.*

dig zu machen, indem er selbst in Wasser loslich wird. Das Versetzen solchen verdorbenen Mehles mit den genannten Sachen aber giebt dem Kleber die Fahigkeit der Teigbildung wieder, indem der Alaun oder der Kupfervitriol eine Verbindung mit dem Kleber eingeht, wodurch er in Wasser wieder unlöslich wird;» Péligot[1]) par contre, dit simplement qu'il ne peut pas s'expliquer pourquoi le sulfate de cuivre agit favorablement sur l'aspect du pain; mais ce qui est certain — ajoute-t-il —, c'est qu'on s'en est servi. L'emploi de cette substance se serait généralisé, en 1816 et 1817, dans toute la Belgique; de là elle se serait répandue en France, et «personne ne peut garantir qu'elle a complètement disparu».

En ce qui concerne l'explication donnée par v. Bibra de l'effet produit par l'alun, il parait qu'elle ne s'appuie sur aucun essai. Quoi qu'il en soit, elle n'est pas juste, ce dont je me suis assuré en essayant d'extraire du gluten de l'échantillon de farine vieille mentionné plus haut (v. p. 192), qui avait été conservé si longtemps qu'il était devenu fortement aigre (p_H^+ de la pâte «etendue» = env. 4. A cet effet, j'en ai préparé deux pâtons, l'un avec de l'eau et l'autre avec une solution à $^1/_2$ % d'alun; mais, malgré tous mes soins, je ne parvins à obtenir du gluten ni de l'un ni de l'autre. Aussi bien parait-il être fort peu probable qu'une farine déja trop acide puisse être «améliorée« en y ajoutant une matière qui, comme c'est le cas pour l'alun, est encore plus acide (une détermination colorimétrique faite sur une solution à $^1/_2$ % d'alun, m'a permis de constater que son p_H^+ = 3,81). — D'après v. Bibra[2]), Liebig aurait, au contraire, amélioré de la farine devenue trop vieille en faisant la pâte dans de l'eau de chaux. Ceci s'accorde parfaitement avec ce que nous venons d'établir au sujet de l'influence de l'acidité.

Si, par contre, on admet que ce soient des farines fraîchement moulues ou bien des farines n'ayant pas été améliorées suffisamment vite par la conservation — et les farines sont très différentes entre elles sous le rapport de la vitesse avec laquelle elles mûrissent[3]) — qui ont été l'objet de ces manipulations, l'explication, en ce qui concerne l'alun, est très simple: c'est que l'alun est un sel a réaction fortement acide qui, ajouté dans la

[1]) *loc. cit.*

[2]) *loc. cit.* Je n'ai pas eu sous mes yeux la propre communication de Liebig.

[3]) Voir par ex. M. P. Neumann, Journ. für das ges. Getreidewesen **1**, 289 (1909).

proportion indiquée, a pour effet d'augmenter la concentration en ions hydrogène de la pâte et, par suite, d'améliorer le pain.

Pour ce qui regarde le sulfate de cuivre, cette explication ne suffit pas. Il est vrai que c'est là aussi un sel à réaction acide: mais, d'un côté, les doses qu'on en aurait employées sont si minimes — $^1/_4$ pour mille au plus —, que leur influence sur la concentration ionique de la pâte doit être pour ainsi dire nulle, et, d'autre part, un essai que j'ai fait avec ce produit m'a démontré que c'est seulement sur de la farine d'une sorte toute spéciale qu'il est capable de produire un effet favorable. Cependant, l'usage fort étendu qu'on en aurait fait d'après Péligot, fait supposer qu'il n'a pas été ajouté à de la farine qui se serait gâtée après avoir été moulue. Il est plus probable, je pense, que la farine ainsi traitée provenait de froment gâté, tel qu'on le rencontre dans les mauvaises années. Malheureusement, il ne m'a pas été possible jusqu'ici de m'en procurer des échantillons, et c'est pourquoi je ne saurais dire comment de telles farines se comporteront.

Que l'explication donnée ci-dessus soit essentiellement juste pour ce qui concerne l'alun, c'est ce que j'ai cherché à démontrer par une série d'essais portant sur la farine N° 11 mentionnée précédemment et conservée pendant quelque temps, série qui fut effectuée simultanément à celle — portant sur la même farine — consignée dans le tableau V et représentée sur la figure IV.

On a fait trois essais, dans lesquels on a préparé la pâte 1^0 avec de l'eau pure, 2^0 avec une solution à $^1/_4$ pour cent d'alun, et 3^0 avec une solution à $^1/_2$ pour cent d'alun, ce qui sont des doses semblables à celles qui, d'après v. Bibra, ont été employées dans la pratique. Voici les résultats obtenus:

Dans l'essai	1	2	3
p_H^+	6,00	5,55	5,35
Volume spécifique .	3,46	3,81	3,68

c'est-à-dire justement l'effet qu'on avait attendu, vu que les autres propriétés du pain, elles aussi, se trouvaient être améliorées de la même façon qu'après une addition d'acide.

Toutefois, cela serait aussi d'un intérêt moindre, si ces remèdes domestiques plus ou moins louches du vieux temps n'eussent été utilisés plus ouvertement de nos jours, bien que sous une forme tant soit peu autre. En effet, dans ces derniers temps — et surtout, paraît-il, en Angleterre —, on a essayé, et parfois même fait breveter, divers procédés ayant pour but d'améliorer la farine ou de la faire «vieillir» artificiellement au moyen d'une

addition quelconque, c'est-à-dire de lui donner d'emblée les qualités qu'elle n'acquiert ordinairement qu'après un temps plus ou moins prolongé. Sauf une seule exception, dont nous parlerons plus tard, toutes ces méthodes consistent essentiellement à ajouter à la farine l'un ou l'autre sel acide ou un acide quelconque. On a même été jusqu'à faire breveter un procédé consistant à faire agir sur la farine un courant d'air ayant au préalable traversé une cartouche remplie de . . . pentachlorure de phosphore. Toutefois, ce sont surtout des phosphates acides de calcium qu'on cherche à employer, en alléguant pour motif ou pour excuse que par ce moyen on arrive à augmenter la qualité nutritive de la farine, qualité qu'on dit avoir été diminuée par suite de ce fait que les débris d'enveloppes, qui renferment la plus grande partie des cendres et partant des phosphates de la farine, ont été enlevés aux farines supérieures de nos jours.

Il est évident que cette manière d'agir s'explique par ce que nous avons exposé dans ce qui précède, et il y aurait peut-être lieu de croire que maintenant on y renoncerait, même si la législature des divers pays ne se sent pas engagé à s'en mêler pour interdire toutes ces sortes de manipulations, ce dont il a été fortement question ces derniers temps en Angleterre. En fait, tout boulanger dispose actuellement d'un moyen tout simple et des plus honnêtes pour remédier aux manques que peut avoir la farine sous ce rapport: il n'y a qu'à donner au lait ou à n'importe quel autre liquide servant à faire la pâte une concentration convenable en ions hydrogène, ce qui peut se faire de façon parfaitement inoffensive.

Les essais ci-dessous montrent que, même si la pâte est faite avec du lait, la concentration optimale des ions hydrogène est supérieure à celle d'une pâte composée de lait frais et de farine sans addition. Dans ces essais j'ai fait usage de lait écrémé et de la farine N° 11 (v. p. 188), et j'y ai ajouté des doses de plus en plus grandes d'acide lactique, avec le résultat que voici:

Millligrammes-équivalents d'acide lactique ajoutés à 1 kgr. de farine	0	6,9	13,8	20,7	27,6
p_H^+	6,45	6,25	6,05	5,80	5,60
Volume spécifique	3,34	3,44	3,40	3,64	3,62
Note	7,77	7,81	7,53	7,73	7,81

Comme on le voit, l'addition d'acide a, ici encore, fait augmenter sensiblement le volume spécifique. Si la note donnée reste sensiblement constante, cela tient à ce que même sans addition d'acide le pain expérimenté n'était pas loin d'être parfait. — Dans les deux

essais où l'on a ajouté les plus fortes quantités d'acide, le lait s'est engrumelé au chauffage sans qu'on ait pu le remarquer dans le pain une fois cuit.

3. Concentration des ions hydrogène des divers produits de mouture.

En outre des moyens d'«améliorer» la farine mentionnés dans ce qui précède, il nous reste à en signaler un qui est d'une tout autre nature, à savoir l'extrait aqueux de sons recommandé par M. A. E. Humphries dans diverses revues de meunerie anglaises[1]) comme étant susceptible, dans certains cas qui ne sont pas spécifiés, d'exercer sur la valeur boulangère de la farine une influence des plus favorables.

Au premier abord, cette affirmation semble s'accorder fort bien avec ce que nous avons dit au sujet de l'importance de la concentration ionique, étant donné que, à en croire tous les savants antérieurs qui se sont occupés de cette question, ce sont les parties extérieures du grain de froment qui possèdent l'acidité la plus élevée. Balland[2]) par exemple, s'exprime comme suit, avec des chiffres à l'appui: «La partie farineuse du grain qui touche à l'enveloppe extrême est plus acide que la portion centrale».

Par contre, cette hypothèse est en désaccord avec un énoncé de Parmentier qui, d'après Balland[3]), savait qu'une addition de son «avait pour effet de rajeunir la farine ancienne», — en d'autres termes, de restituer la farine devenue trop aigre.

Cependant, la supposition que la partie extérieure du grain de froment est plus acide que la portion centrale, n'est pas exacte; c'est tout le contraire qui est vrai: c'est la portion centrale qui est la plus acide, qui a la plus grande concentration en ions hydrogène. On peut facilement s'expliquer la raison de cette erreur: elle tient à la manière dont on a déterminé l'acidité, et nous avons là une preuve concluante de l'exactitude de la thèse de S. P. L. Sørensen citée

[1]) Voir par ex. Supplement to the Journ. of the Board of Agriculture, Vol. XVII Nr. 3, June 1910, p. 43, — et Milling, 4 févr. 1911, p. 108, et 23 oct. 1909, p. 478.

[2]) C. r. **97**, p. 346, et Journ. de pharm., 5, **8**, p. 347 (1883).

[3]) C. r. **97**, p. 651 (1883). Je n'ai pas pu me procurer le mémoire original de Parmentier, travail qui doit probablement dater du dernier quart du dix-huitième siècle, époque à laquelle Parmentier s'intéressait vivement à tout ce qui concerne la panification du froment.

plus haut (v. p. 176), d'après laquelle on ne peut pas, à l'exemple de tous les chercheurs d'autrefois, déterminer par titration la concentration des ions hydrogène, c'est-à-dire le degré d'acidité réel.

Si, en effet, on prépare des extraits aqueux des différents produits de mouture d'un même froment — par exemple trente-six pour cent de farine première, trente-six pour cent farine deuxième, et le son restant —, puis qu'on ajoute de la phénolphtaléine à chacun des trois extraits pour les titrer ensuite à l'aide de l'hydroxyde de sodium jusqu'à coloration rouge, on arrive, il est vrai, au même résultat que Balland, c'est-à-dire qu'on constate que la farine à 0—36 pour cent demande, pour faire virer au rouge, la plus faible proportion de soude, tandis que la farine à 36—72 pour cent en exige un peu plus, et les issues beaucoup plus, résultat qui suivant les idées anciennement admises revient à dire que les issues constituent le produit le plus acide. Mais que, dans les mêmes extraits, on vienne à déterminer la concentration des ions hydrogène soit par électrométrie ou par colorimétrie[1]), on trouvera que l'extrait de son a la concentration en ions hydrogène la plus basse, et que celle-ci augmente dans la farine ordinaire pour atteindre son maximum dans celle, plus fine, provenant de la portion centrale du grain.

A titre d'exemple, je citerai l'essai ci-dessous. Du reste, on pourrait en citer tant et plus; en tout cas, je n'ai rencontré aucune exception.

Je préparai un extrait aqueux par le procédé dont je me suis habituellement servi pour ce travail, en traitant pendant deux heures 1 partie de farine ou de son (ce dernier divisé aussi finement que possible dans un moulin à café) par quatre parties d'eau glacée, et filtrant le mélange.

	Farine à 0—36 %	Farine à 36—72 %	Sons
Soumis à la titration, 50 cc. des liquides filtrés, pour virer au rouge en présence de la phenolphtaléine, ont exigé .	0cc,50	0cc,78	3cc,5n/5 NaOH
En mesurant électrométriquement ces mêmes liquides, on a trouvé $p_H^{=}$ = ...	6,06	6,14	6,55

[1]) La mesure colorimétrique d'un extrait aqueux de sons est assez difficile à cause de sa couleur propre.

On voit donc que la farine la plus fine, celle qui provient de l'intérieur du grain, est en réalité la plus acide, qu'elle possède la concentration en ions hydrogène la plus élevée, et que, par contre, elle contient comparativement à la partie extérieure du grain, une proportion moindre de phosphates ou d'autres substances capables de faire office de «tampons»[1]). Conséquemment, malgré la concentration plus forte en ions hydrogène, la farine fine se contente d'une dose d'hydroxyde de sodium moins élevée que celle exigée par les issues pour abaisser ladite concentration jusqu'à la valeur à laquelle est situé le point de virage de la phénolphtaléine.

D'après ce qui précède, on comprend que Parmentier puisse avoir trouvé qu'une addition de son est propre à «rajeunir la farine ancienne»; mais on comprend moins que Humphries puisse avoir obtenu des résultats favorables en ajoutant un extrait de son à de la farine fraîchement moulue. Aussi, dans des pains faits en y ajoutant de l'extrait de son, une série d'essais m'a permis de constater un volume spécifique décroissant en même temps que la concentration en ions hydrogène, régulièrement bien que faiblement, au fur et à mesure que la dose d'extrait de son était augmentée.

D'un autre côté, il y a lieu de rappeler ici le fait que les extraits de son constituent un milieu des plus favorables pour les bactéries et, par conséquent, si nous pouvions admettre que, en préparant quelques-uns des extraits servant à ses essais, Humphries ait négligé de prendre des précautions suffisantes pour empêcher l'action de ces organismes, de sorte que les extraits en question seraient devenus acides, alors les résultats obtenus par le savant anglais s'expliqueraient facilement à tous les points de vue.

4. Extraction de gluten utilisée comme méthode analytique.

Il ne nous reste plus à parler que d'un certain fait ayant quelque rapport avec ces recherches.

Si, dans l'intention d'en retirer du gluten par lavage, on fait avec une certaine farine un pâton en utilisant le mélange d'acide qui, d'après ce qui précède, a fourni le meilleur résultat dans l'essai de cuisson, on remarquera que le pâton prend immédiate-

[1] S. P. L. Sørensen: *l. c.*

ment une consistance un peu plus visqueuse que lorsqu'il a été fait avec de l'eau pure; mais lorsqu'il aura reposé une heure environ, il fait une excellente impression, étant lié et élastique, précisément comme il doit l'être. Cependant, si alors on essaie d'en retirer par lavage un morceau de gluten, on n'y parviendra nullement: le tout se résout et tombe en poudre, même si l'on lave avec les plus grandes précautions en passant au tamis de soie le plus fin, et même une dose d'acide considérablement plus faible que celle qui donne l'optimum de volume spécifique et de valeur boulangère en général, empêche complètement la formation de gluten.

C'est ainsi que je me suis appliqué à extraire du gluten de la farine N° 11 (Tableau II) en faisant le pâton avec les liquides utilisés dans les quatre premiers essais avec l'acide chlorhydrique. Voici les résultats:

1° 25 gr. de farine et 15 cc. d'eau distillée. Exposant des ions hydrogène de la pâte «étendue» (p. 177) $p_H^+ = 6{,}10$.

On a obtenu 8gr,3 de gluten brut, un peu «court» peut-être, mais d'ailleurs de bonne qualité.

2° 25 gr. de farine et 15 cc. de mélange d'acide (HCl au $^1/_{42}$). p_H^+ de la pâte «étendue» = 5,05.

On n'a pas été à même d'obtenir de gluten cohérent; le tout s'est résous en particules qui passèrent au travers du tamis et l'obstruèrent en partie. Toutefois, au début, le pâton était d'un fort bel aspect; il paraissait être des mieux réussis, d'une ténacité satisfaisante.

3° et 4° Acide respectivement $1^1/_2$ et 2 fois plus fort qu'en 2°, on a obtenu des résultats identiques, et il en fut de même d'un essai avec l'acide phosphorique et des concentrations semblables des ions hydrogène dans la pâte «étendue».

Il appert donc que déjà dans l'essai N° 2 la dose d'acide suffit pour empêcher la formation de gluten, alors que c'est seulement la proportion double qui donne l'optimum de valeur boulangère.

Or, c'est un fait connu depuis longtemps déjà que le rendement en gluten se trouve diminué par l'addition d'acide à la pâte, en tout cas si la dose dépasse une certaine limite très étroite[1]; et il est de fait aussi que les vieilles farines aigries ne

[1]) Voir W. Johannsen, Om Gluten og dets Plads i Hvedekornet. Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet, **2**, 332 (1888). Résumé en français. 199.

peuvent pas fournir de gluten. Mais on n'a pas voulu reconnaitre que la diminution ou la disparition du gluten est due à l'augmentation de l'acidité. Bien au contraire, ainsi que le dit Balland[1]): «L'acidité, dans les vieilles farines, n'est pas, comme on l'a admis, la cause de la disparition du gluten; elle en est la conséquence: elle ne précède pas l'altération, elle la suit». Toutefois, à l'endroit cité, il ne fournit pas de preuve à l'appui de cette assertion, et je n'en ai également pas trouvé ailleurs. Il est étrange que ni lui ni aucun autre chercheur n'aient eu l'idée d'essayer si, en neutralisant l'acide, la farine aigrie ne pourrait recouvrer le pouvoir de fournir du gluten. J'ai pu constater, en effet, qu'elle le peut; les essais ci-dessus portant sur les vieilles farines aigries mentionnées p. 192 le démontrent.

Pour donner à la pâte «étendue» une réaction très faiblement acide sur du papier de tournesol très sensible ($p_H^+ = 6{,}5$ env.), l'une de ces farines, A, exigea une addition de 8 cc. de lessive de soude norm. au $^1/_5$ à 25 gr. de farine, l'autre, B: $8^{cc},5$.

Avec chacun de ces deux farines on a préparé alors quatre pâtons:

A. 1) 25 gr. de farine + 0 cc. NaOH au $^1/_5$ + 15 cc. d'eau
2) — — + $2^{cc},7$ — — + $12^{cc},3$ —
3) — — + $5^{cc},3$ — — + $9^{cc},7$ —
4) — — + $8^{cc},0$ — — + $7^{cc},0$ —

B. 1) 25 gr. de farine + 0 cc. NaOH au $^1/_5$ + 15 cc. d'eau
2) — — + $2^{cc},8$ — — + $12^{cc},2$ —
3) — — + $5^{cc},6$ — — + $9^{cc},4$ —
4) — — + $8^{cc},5$ — — + $6^{cc},5$ —

En lavant de la manière habituelle les pâtons à l'aide d'un tamis de soie, on a obtenu:

A. 1) Pas la moindre trace de gluten.
2) Egalement pas; pourtant on a remarqué que la masse humide avait une certaine tendance à «rouler» sur le tamis et à former de petites «saucisses», qui cependant se sont résoutes peu à peu.
3) $4^{gr},5$ de gluten brut, très «court» et non élastique.
4) $9^{gr},8$ — , assez «court» et pas des plus faciles à recueillir.

[1]) C. r., **97**, 651 (1883).

B. 1) Pas la moindre trace de gluten.

2) Egalement pas; la masse au tamis accusait une très faible tendance à «rouler».

3) 2 gr,4 de gluten brut, très «court» et friable, absolument dépourvu d'élasticité et difficile à recueillir.

4) 8 gr,4 de gluten brut de qualité passablement bonne, quoique assez «court».

Ces essais, dans lesquels on a ajouté soit des acides à de la farine fraîchement moulue, soit des bases à de la farine vieille, semblent démontrer que

1° La diminution de la teneur en gluten qu'on dit souvent avoir lieu lorsque la farine, en vieillissant, devient de plus en plus aigre, n'est due qu'à l'action dissolvante exercée sur le gluten par l'acide formé, et non (du moins pas d'une façon appréciable) à une transformation des composants mêmes du gluten.

En nous reportant à ce qui a été dit plus haut au sujet de l'importance qu'a la concentration des ions hydrogène pour la valeur boulangère, nous voyons en outre, que

2° L'extraction du gluten par lavage doit être définitivement et irrévocablement considérée comme étant sans aucune valeur en tant que méthode analytique servant à déterminer la valeur industrielle d'une farine de froment.

A la vérité, l'expérience a montré à la longue que l'extraction de gluten n'a guère de valeur sous ce rapport; mais néanmoins, jusque dans ces temps derniers, on s'est beaucoup occupé de cette question. A mon avis, il ne servira plus à rien de continuer ce travail.

Par là je ne prétends nullement préjuger la question relative au rôle que peut jouer la teneur de la farine en gluten, c'est-à-dire en substances protéiques, azotées, insolubles dans l'eau. Mon appréciation ne se rapporte qu'à la manière dont on a procédé pour déterminer cette teneur.

Résumé.

1° Pour la pâte d'une farine de froment quelconque il existe une concentration en ions hydrogène déter-

minée à laquelle le pain provenant de cette farine sera le mieux réussi, et cette concentration est supérieure à celle que l'on trouve dans une pâte préparée avec la farine en question fraîchement moulue et de l'eau distillée pure ou du lait frais.

2° Cette concentration optimale correspond approximativement à l'exposant des ions hydrogène $p_H^+ = 5$; pour les farines de choix elle paraît être un peu plus élevée, pour les sortes ordinaires ou mauvaises, au contraire, légèrement inférieure.

3° Des différents produits de mouture d'un même froment, c'est la farine la plus fine — celle qui provient de la portion centrale du grain — qui présente la plus forte acidité, autrement dit, la plus grande concentration en ions hydrogène, tandis que le son est le moins acide, a la moindre concentration en ions hydrogène.

4° Les divers moyens artificiels prônés ces derniers temps comme étant capables d'améliorer la farine, n'ont guère d'autre effet que celui d'augmenter la concentration des ions hydrogène de la pâte.

5° L'opinion émise par plusieurs savants d'autrefois d'après laquelle l'addition d'alun souvent utilisée anciennement s'appliquait aux farines gâtées, c'est-à-dire à celles qui s'étaient gâtées après la mouture, n'est certainement pas juste.

6° L'extraction du gluten par des lavages, en tant que méthode analytique servant à déterminer la valeur boulangère d'une farine, est sans aucune valeur.

Qu'il me soit permis, en terminant, de faire observer que les essais dont je viens de faire l'exposé ne constituent, au fond, qu'une partie d'un travail plus étendu dont le but est de rechercher la corrélation existant entre la composition chimique de la farine et sa valeur boulangère. Cependant, comme ce travail est encore loin d'être terminé et que, néanmoins, les essais précédemment relatés me semblent donner lieu à des conclusions d'un certain intérêt, j'ai cru ne devoir plus tarder à les livrer à la

publicité, bien que je sache mieux que personne jusqu'à quel point ces essais présentent un caractère purement provisoire. Aussi, pour peu que j'en aie le temps et les forces, ai-je l'intention de poursuivre ce travail et de le compléter dans les directions où il y aura lieu.

En terminant, je me fais un devoir de présenter encore ici a mon chef M. le Professeur et Dr S. P. L. Sørensen, l'hommage de ma vive gratitude pour avoir bien voulu m'accorder le loisir de faire ce travail, comme aussi pour m'avoir aidé de ses conseils. J'ai à remercier également M. R. Rubow, directeur de la société meunière Malmö stora Valskvarn à Malmö, qui a donné la première impulsion à ces recherches et m'a prêté constamment un précieux concours.

Je dois également mes sincères remerciements à mes collègues MM. S. Palitzsch et E. Jürgensen pour s'être chargés des mesures électriques, ainsi qu'à M. C. A. Steenstrup, qui m'a secondé de diverses manières.

Enfin, il me reste à mentionner, avec un vif sentiment de reconnaissance, que les nombreux essais de cuisson ont été effectués par M. A. Horup, contre-maître de la société sus-indiquée, et M. J. Rasmussen, maitre boulanger à Copenhague. Sans leur zèle intelligent et infatigable je n'eusse rien pu accomplir.

Juillet 1911.

RECHERCHES SUR LES ORGANISMES DE FERMENTATION

PAR

ALB. KLÖCKER.

I.

Recherches sur quelques nouvelles espèces de Pichia, et remarques relatives aux descriptions spécifiques des Saccharomycètes en général.

I.

(Avec Table I).

ALORS que les microbiologistes d'autrefois, comme par ex. Brefeld, professaient la manière de voir que les Saccharomycètes ne comprenaient qu'un petit nombre d'espèces, les investigations faites pendant ces dernières années ont montré qu'il n'en est point ainsi, et qu'à la famille des Saccharomycètes appartiennent, au contraire, un très grand nombre d'espèces réunies sous divers genres, dont le nombre ira même sans doute en augmentant à l'avenir. Toutefois, les espèces établies ont en grande partie été décrites d'une façon si peu satisfaisante qu'on est dans l'impossibilité de les identifier.

Lorsque, en 1904, Hansen publiait ses «Lignes fondamentales de la classification des Saccharomycètes»[1]), le tout était, à vrai dire, dans un chaos inextricable. La division de l'ancien genre Saccharomyces était devenue indispensable. Parmi les nouveaux genres établis alors par Hansen, se trouvait celui qu'il dénomma Pichia, et dont le type est Pichia membranæfaciens. Les caractères de ce genre sont d'après Hansen les suivants: «La surface du liquide nutritif sucré ne tarde pas à se recouvrir d'un voile épais, sec et mélangé d'air. La spore est

[1]) Centralbl. f. Bakt., Par. u. Inf., 2. Abt., **12**, 529 (1004), et Comptes-rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg, **9**, 48 (1911).

hémisphérique, ou irrégulière et anguleuse. Aucune fermentation; forte formation de mycélium.»

Comme on le voit, en la mettant parmi les caractères génériques, Hansen relève l'impuissance à provoquer la fermentation; mais il est à noter que plus tard on a reconnu que ce caractère doit être supprimé. Dans ma «Méthode pour reconnaître la présence de petites quantités d'alcool dans des liquides en fermentation, et quelques résultats qu'elle a permis d'obtenir»[1]), j'ai signalé que le type de ce nouveau genre, le Pichia membranæfaciens, peut former de petites quantités d'alcool aussi bien dans les solutions de dextrose que dans celles de lévulose[2]). On trouvera de plus amples éclaircissements sur ce sujet dans le mémoire ci-dessus mentionné. Plus tard, j'ai trouvé plusieurs autres espèces qui, au point de vue de la formation de voile et d'alcool, se comportent toutes de la même manière que le Pichia membranæfaciens, tandis que sous d'autres rapports elles en diffèrent. Ces espèces rentrent donc néanmoins dans le genre Pichia.

Ayant trouvé quelques nouvelles levures qui, bien que ne possédant que partiellement les caractères ci-dessus en commun avec le genre Pichia, paraissaient devoir y être rapportées, j'ai ainsi été amené à faire les recherches dont on va lire l'exposé. Ces caractères, toutefois, ne sont pas de ceux qui ordinairement font partie des diagnostics génériques, et ce n'est que par exception que Hansen y a eu recours pour le Pichia. L'un de ces caractères est l'action exercée sur les diverses espèces de sucre — ce caractère toutefois n'est plus applicable maintenant que le type de ce genre, Pichia membranæfaciens, s'est trouvé être capable de former de l'alcool —; l'autre est déterminé par la forme qu'affectent les spores. L'énoncé de Hansen disant au sujet de Pichia, que la spore doit être hémisphérique ou irrégulière et anguleuse, est exact pour la grande majorité des spores; ce n'est qu'exceptionnellement qu'on en rencontre qui soient entièrement sphériques. Hansen dit que la jeune spore est d'ordinaire de forme hémisphérique, alors que la spore plus ancienne devient le plus souvent anguleuse et irrégulière. En conséquence, rien n'empêche de rapporter au genre Pichia des espèces qui d'ailleurs en ont les caractères, mais qui en

[1]) Comptes-rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg, **10**. 99 (1911).

[2]) Lindner est arrivé au même résultat au moyen de sa «Kleingärmethode».

différent par leurs spores sphériques. Hansen dit en outre que le Saccharomyces farinosus et le Saccharomyces hyalosporus appartiennent probablement, eux aussi, au genre Pichia, et pourtant ces deux espèces ont les spores sphériques. C'est pourquoi, tant dans le «Handbuch der technischen Mykologie» de Lafar que dans la 2ème édition de mon livre intitulé »Die Gärungsorganismen in der Theorie und Praxis der Alkoholgärungsgewerbe», j'ai ajouté dans le diagnostic en question: «Sporen rundlich[1]), halbkugelförmig, etc.». Saito[2]) mentionne une espèce ayant les spores globuliformes et provoquant la fermentation; bien que n'en donnant pas de description détaillée, son avis est — contrairement au mien —, qu'il convient de la placer dans un nouveau genre, parce que, à l'égard de la forme de la spore, le diagnostic du genre Pichia ne s'applique pas à cette espèce.

Ainsi que nous l'avons vu, dans la classification de Hansen le genre Pichia se trouve dans le 2ème groupe, groupe caractérisé par ce fait que »dans les milieux nutritifs sucrés les cellules forment immédiatement un voile sec». Ceci donne lieu à quelques observations.

Lorsqu'on veut examiner, quant aux Saccharomycètes y contenus, de la terre, des parties végétales ou d'autres matières prises dans la nature même, on commence habituellement par placer l'échantillon en question dans du moût de bière additionné d'un peu d'acide tartrique. Afin de faire apparaître les espèces à formation de voile — Pichia et Willia — qui pourraient y exister, il est nécessaire de laisser ces cultures en repos pendant un temps assez long, ces espèces n'apparaissant ordinairement qu'à une phase plus avancée, surtout en présence d'organismes qui se développent plus rapidement. Au cours des nombreuses analyses de terre, de lichen, de mousse, d'écorce, *etc.*, que j'ai effectuées à l'occasion des recherches de Hansen sur la circulation des Saccharomycètes dans la nature, il est arrivé très fréquemment que seulement les flacons ayant été abandonnés longtemps au repos montraient le voile qui caractérise les genres Pichia et Willia. En conséquence, prenant comme point de départ un pareil voile, j'isolai à l'état de pureté cette espèce à

[1]) Il eût mieux valu mettre «kugelig».

[2]) Centralbl. f. Bakt., Par. u. Inf., 2. Abt., **17**, 20 (1906).

formation de voile; mais parfois il arriva que la culture, ensemencée sur du moût renfermé dans des flacons Freudenreich, ou bien ne formait point de voile, ou bien n'en engendrait qu'un extrêmement mince, presque imperceptible, et que la croissance en général avait lieu très lentement. Pensant que la petitesse de la dose ensemencée pouvait bien en être cause, je préparai des colonies gigantesques sur du moût gélatiné, où la croissance fut assez forte, et j'ensemençai dans du moût renfermé dans des flacons Freudenreich une portion importante d'une de ces colonies gigantesques; mais, dans ce cas non plus, la formation de voile typique ne se produisit pas.

Ayant ensuite constaté que dans les flacons contenant l'échantillon original à examiner, il s'était formé, au moment de l'apparition du voile, des quantités plus ou moins fortes d'alcool dû à d'autres Saccharomycètes ou à des Mucor, l'idée me vint d'essayer si dans un liquide nourricier contenant de l'alcool, par ex. de la bière, les espèces isolées formeraient plus facilement un voile. Ces essais portèrent sur trois formes différentes, que j'ensemençai sur de la bière double et sur de la bière de garde, tant seules qu'additionnées d'alcool. Je pus alors observer, que, surtout sur la bière double, qu'elle ait été additionnée d'alcool au non, il se formait rapidement un voile fort épais. Dans le but de vérifier si réellement l'alcool était pour quelque chose dans la formation du voile, je fis un ensemencement dans des flacons Freudenreich renfermant du moût additionné de deux gouttes d'alcool. La formation de voile étant typique dans ces cultures aussi, nous devons donc admettre que l'alcool est d'une importance essentielle pour la formation de voile chez ces levures. D'accord avec ce résultat, Hansen et Seifert avaient signalé que l'énergie de la croissance chez les Saccharomycètes à formation de voile se trouve favorisée par l'addition d'alcool, et Seifert affirme en outre que l'acide acétique aussi produit le même effet. J'ai pu constater l'exactitude de cet énoncé pour une des espèces que j'ai expérimentées. A ce propos, il est à noter qu'une levure à formation de voile découverte par Saito[1]) dans le soïa, ne forme de voile complet que sur la décoction de soïa. Il ne dit rien de la manière dont elle se comporte vis-à-vis de la bière. Lorsque je semais ces espèces dans des bal-

[1]) A l'endroit cité.

lons Pasteur de 1/1 litre contenant du moût, un voile épais et compact se formait immédiatement: c'est ainsi qu'un large accès d'air a également une importance particulière.

Il est une autre espèce que j'ai découverte, et cette espèce qui, en raison de la structure de ses spores, doit être rangée dans le genre Willia, ne formait également, sur du moût renfermé dans de petits flacons, qu'un voile excessivement faible, ou même n'en formait point. Dans ce cas-ci, une addition d'alcool au moût ne produisit que peu ou point d'effet; par contre, cultivée sur de la bière double, cette espèce donna un voile de Willia tout à fait typique. Dans les cas où un voile se formait sur le moût, ce voile présentait un aspect différant de celui qui caractérise ordinairement les voiles de Willia: il était glaireux et luisant, rappelant celui qui recouvre une vieille végétation de Saccharomyces.

En conséquence, lorsqu'il s'agira de déterminer si une levure quelconque appartient au groupe qui comprend les genres Pichia et Willia, il faudra la semer sur du moût additionné d'alcool (dans la proportion de 2 à 4 gouttes pour 10 cc. de moût) et éventuellement aussi sur de la double bière[1]), bien entendu seulement si l'on n'emploie pas les grands ballons Pasteur, mais les petits flacons Freudenreich, généralement utilisés.

Dans ce qui va suivre, je donnerai la description de quatre nouvelles espèces de Pichia, qui sont caractéristiques sous plusieurs rapports.

Pichia suaveolens n. sp.

(Table I, fig. 1.)

Sur le moût de bière, il se forme après 24 heures, à une température de 25°, un voile mince, grisâtre, qui se répand le long de la paroi du flacon et arrive peu à peu à former un anneau de levure épais et blanc, duquel partent parfois des ramifications arborescentes qui longent la paroi. Les cellules du voile sont sphériques ou ovales, longues de 5 à 8 μ; celles de l'anneau, régulièrement sphériques.

Sur la bière double apparaît immédiatement un voile plissé blanc, qui grimpe également le long de la paroi du flacon; peu à peu, il s'épaissit, devient très compact et prend en même

[1]) Une autre bière riche en extrait pourra sans doute aussi servir.

temps une teinte d'un gris jaunâtre. Les cellules présentent la même forme que celles du voile qui recouvre le moût.

A la température de 34°, les cellules du voile du moût ont la même forme qu'à 25°.

Les limites de température entre lesquelles se forme le voile sur le moût, sont les suivantes:

Température maxima: 34 à 36°
— minima: 10 à 4°

Entre 3 et 4°, il n'y a pas de formation de voile, mais seulement un très faible développement de dépôt. A $^1/_2$°, la croissance s'arrête entièrement.

Les spores sont globuliformes ou peut-être parfois légèrement aplaties à l'un des deux bouts; le plus souvent une cellule en renferme deux, au centre desquelles on aperçoit un petit globule réfringent (les spores-perles de Lindner); elles ont environ 2 μ de diamètre. Ces spores ne se forment pas ou que très difficilement sur les blocs de plâtre après culture préalable en moût; cultivées dans de l'eau de levure mélangée de 10 % de dextrose, elles se développent un peu mieux, bien qu'en petit nombre seulement. Sur une solution aqueuse contenant 10 % de saccharose, quelques rares cellules renfermaient des spores.

Après culture préalable dans l'eau de levure à 10 % de dextrose, la sporulation sur les blocs de plâtre se produit entre les températures limites suivantes:

Maximum: 29 à 33°
Minimum: env. 10°

Les colonies gigantesques sur le moût gélatiné ne font pas liquéfier la gélatine.

Dans le moût, cette espèce produit une faible fermentation en même temps qu'une odeur d'éther de fruit, odeur qui est plus marquée lorsque la croissance a lieu sur la double bière. Elle fermente le dextrose et, après interversion préalable, le saccharose. Elle produit également l'odeur d'éther de fruit dans les solutions de ces deux sucres, mais à un degré peu prononcé. Elle ne fermente ni le lactose, ni le maltose.

Elle a été découverte dans le sol en Danemark, en octobre 1904.

Une tendance qu'ont parfois les spores d'affecter la forme d'un segment de sphère (mais sans filet, et par suite pas celle

de «chapeau»), jointe à la formation d'éther de fruit au cours de la fermentation, fait de cette espèce une forme transitionnelle entre les deux genres Pichia et Willia.

Pichia alcoholophila n. sp.

(Table I, fig. 2 et 3.)

Sur le moût contenu dans de petits flacons où l'air n'a guère accès (dans les flacons Freudenreich, par ex.), il ne se forme généralement pas de voile, ou tout au plus s'en forme-t-il un extrêmement faible; le développement se fait, en général, très lentement. Par contre, dans les ballons Pasteur de $^1/_1$ litre, à la température de 25°, la surface du moût se recouvre en quelques jours d'un voile épais et compact.

Sur le moût additionné d'alcool (deux à trois gouttes d'alcool concentré dans env. dix cc. de moût), il se forme, après un à deux jours à 25°, un voile typique, blanchâtre et légèrement plissé, qui grimpe un peu le long de la paroi du flacon. Avec le temps, ce voile peut devenir très épais, blanc et fortement plissé. En même temps que le voile, il se forme un abondant dépôt de levure et un anneau de levure; ce dernier grimpe le long de la paroi du flacon, formant souvent des arborisations rappelant les cristaux de glace aux fenêtres. A la longue, la plus grande partie du voile tombe au fond du récipient.

Sur la double bière, il se produit une abondante formation de voile.

Dans un jeune voile formé à la température de 25°, les cellules affectent la forme de boudin et sont deux à quatre fois plus longues que larges. La grosseur en est assez variable; la plupart des cellules ont une longueur de 6 à 9 μ. On ne voit que très peu de cellules ovales. Elles se trouvent la plupart du temps à une ou à deux. Au bout de quelques jours de repos à 25°, les cellules prennent en grande partie la forme sphérique, et après un repos prolongé, on voit apparaître toutes sortes de formes, même par ex. des cellules très longues et très minces.

A 33°, les cellules revêtent principalement la forme sphérique, et la grandeur va en augmentant. Entre 3 et 4°, température à laquelle il ne se forme pas de voile, la levure de dépôt se compose principalement de petites cellules ovales; des cellules

relativement grandes ayant la forme de boudin ne s'y trouvent qu'en très petit nombre seulement.

Les températures limites entre lesquelles se produit la formation de voile sur le moût additionné d'alcool, sont les suivantes:

Maximum: 33° à 35°
Minimum: 8° à 4°

Entre 3° et 4°, il ne se forme que de la levure de dépôt, et à $^1/_2$°, le développement cesse complètement.

Les spores sont des spores-perles sphériques ou hémisphériques; dans les cellules longues, elles sont souvent comprimées et prennent la forme d'un boudin court et épais. On en aperçoit aussi qui ont une forme irrégulière. La plupart des spores ont un diamètre allant de 1,5 à 2 μ; toutefois on peut en rencontrer, mais très rarement, dont le diamètre est de 3 μ ou au-dessus. Il s'en forme abondamment dans le voile sur le moût avec alcool et dans celui sur la double bière. Une cellule renferme ordinairement quatre spores; parfois, et même assez souvent, il ne s'y en trouve que deux. Dans les colonies gigantesques engendrées sur le moût gélatiné, on rencontre de très grandes cellules (d'une longueur de 16 à 17 μ et même plus), qui peuvent renfermer jusqu'à quinze spores; le plus souvent, elles n'en ont que dix ou huit. Ces spores sont plus petites que celles qui se trouvent dans les voiles et sur les blocs de plâtre (Table I, fig. 3).

Les températures limites de la sporulation sur bloc de plâtre après culture préalable sur du moût additionné d'alcool, sont:

Maximum: 29° à 33°
Minimum: 4° à $^1/_2$°

Le moût gélatiné qui nourrit des colonies gigantesques, se trouve partiellement liquéfié au bout d'un mois et demi environ.

Cetta espèce peut fermenter le dextrose, mais par très faibles quantités seulement; par contre, elle ne fermente ni le saccharose, ni le maltose, ni le lactose. Les phénomènes de fermentation ne se remarquent pas dans les solutions de dextrose.

Elle a été trouvée au Danemark dans le sol.

Ce qui distingue principalement cette espèce, c'est le fait qu'elle ne forme pas de voile lorsqu'elle croît sur du moût sans alcool, ou sans que l'air y arrive très largement; puis sa formation d'asques gigantesques renfermant de nombreuses spores.

Pichia polymorpha n. sp.

(Table I, fig. 4 et 5.)

A la température de 25°, le moût se recouvre du jour au lendemain d'un fort voile blanc et uni, qui s'étend un peu sur la paroi du flacon. Le voile demeure uni, et il se forme une couche épaisse de levure de dépôt. Un anneau de levure d'une couleur jaune blanchâtre se développe rapidement; avec le temps il devient tout à fait jaune.

Sur la double bière, il se forme un voile semblable.

A cette même température de 25°, les cellules du jeune voile sont d'abord allongées, généralement plus pointues à l'un des bouts qu'à l'autre, rappelant presque la forme d'une carotte.

Toutefois, il y en a dont la coupe transversale est un peu plus grande, de sorte qu'elles sont alors plutôt oviformes, quoique plus allongées qu'un œuf. Elles peuvent atteindre une longueur d'environ 13 μ. Souvent le bourgeonnement se fait latéralement.

Après quelques jours de séjour à 25°, la grande majorité des cellules sont sphériques, et, dans un voile de deux mois, elles apparaissent très petites, globuliformes ou ovales. Dans l'anneau de levure, les cellules sont également très petites et globuliformes. On n'y rencontre qu'un très petit nombre de grosses cellules de repos rondes.

Entre 36 et 37°, température à laquelle la croissance ne laisse encore rien à désirer, presque toutes les cellules sont complètement sphériques et réunies en groupes (v. Table I, fig. 5); mais entre 34 et 35°, leur forme est essentiellement la même qu'à 25°, bien qu'un peu moins allongée, et il y en a beaucoup qui sont ovales ou ovoïdes, rappelant plutôt un œuf de vanneau, donc beaucoup plus pointues à l'un des deux bouts. A 39°, les cellules sont sphériques ou ovales; parfois cependant on remarque à cette température beaucoup de cellules ayant la forme d'un citron (rappelant celles du Saccharomycodes Ludwigii), et d'autres ayant celle d'une poire; par contre, la forme de boudin est extrêmement rare.

A $^1/_2{}^0$, les cellules revêtent la forme de boudin ou d'ellipsoïde (non pas celle de carotte); dans la levure de dépôt, elles sont principalement ellipsoïdales.

Les cultures sur blocs de plâtre présentent souvent des formes cellulaires très bizarres.

Les températures limites de la formation de voile sur moût, sont:

Maximum: ..... env. 39^0
Minimum: au-dessous de $^1/_2{}^0$

Les spores sont des «perles» sphériques ayant un diamètre d'env. 4 μ. Elles se forment avec une extrême difficulté et n'ont été trouvées que sur blocs de plâtre à la température ordinaire de la chambre, après culture préalable des cellules dans l'eau de levure additionnée de dextrose. C'est pourquoi il n'a pas été possible de déterminer les températures limites de leur développement.

Les colonies gigantesques sur moût gélatiné amènent au bout de quelque temps la liquéfaction de la gélatine.

Cette espèce fait fermenter le moût, les solutions de dextrose et, après interversion, celles de saccharose. Elle a également le pouvoir de fermenter une très petite quantité de maltose, mais dans les solutions de ce sucre on ne peut voir aucune fermentation. Elle ne fermente pas le lactose.

Cette espèce a été trouvée dans le sol en Danemark.

Elle se distingue surtout par un polymorphisme peu commun: il n'existe guère de forme cellulaire qu'elle ne puisse revêtir.

Pichia calliphoræ n sp.

(Table I, fig. 6.)

Sur le moût, il apparaît bientôt un voile mince blanc, qui grimpe le long de la paroi du flacon; ce voile est plus épais et plus compact dans les ballons Pasteur de $^1/_1$ litre. A la longue, ce voile peut disparaître presque tout à fait et tomber au fond. En même temps il se forme un mince anneau de levure, qui a une tendance à former des ramifications arborescentes.

La double bière se recouvre d'un voile épais et compact.

Dans le jeune voile à la température de 25^0, les cellules affectent pour la plupart la forme de boudin; leur longueur peut

atteindre 13 μ. Cependant il y en a aussi qui sont ovales, sphériques ou quelquefois en forme de tonneau, c. à. d. qu' elles sont plus épaisses au milieu. La levure de dépôt se compose en majeure partie de cellules plutôt ellipsoïdales. Après quelques jours, on voit apparaître nombre de cellules de dimensions minimes, auxquelles plus tard viennent s'associer des cellules plus longues réunies en colonies. Sur blocs de plâtre à la température ordinaire du laboratoire, la plupart des cellules paraissent être ellipsoïdales, souvent garnies de deux bourgeons à chacun des deux bouts, à l'instar des cellules de Dematium.

A 33°, les cellules du voile formé sur le moût sont généralement plus grandes et plutôt ellipsoïdales; entre 3 et 4°, elles prennent la forme d'un ellipsoïde allongé, et à $^1/_2$°, la levure de dépot se trouve formée par des cellules ellipsoïdales et globuliformes qui sont assez grandes.

Les températures limites de la formation de voile sur moût, sont:

Maximum: 33° à 35°
Minimum: 4° à $^1/_2$°

A $^1/_2$°, on observe encore un développement, mais uniquement de levure de dépôt.

Les spores sont de petites «perles» globuliformes, parfois anguleuses ou hémisphériques; il y en a deux à quatre dans une cellule; étant souvent soudées ensemble, il est assez difficile de constater leur forme.

Les températures limites de la sporulation sur blocs de plâtre après culture préalable dans le moût, sont:

Maximum: 24° à 27°
Minimum: 10° à 7°

Le plus grand nombre de cellules sporifères se forme à 15° environ; du reste, les spores se forment lentement et le plus souvent en assez petit nombre.

Les colonies gigantesques sur moût gélatiné montrent toutes sortes de formes, même de très longues et très minces, réunies en grandes colonies. La gélatine se liquéfie peu à peu.

Cette espèce provoque une faible fermentation dans le moût, ainsi que dans les solutions de dextrose; par contre, elle est incapable de fermenter le saccharose, le maltose et le lactose.

Elle a été trouvée, en novembre 1900, dans une mouche, Calliphora erythrocephala, qui avait été prise dans le jardin de Carlsberg.

2.

Il est évident que, pour établir des espèces nouvelles, il faut avant tout s'appliquer à en faire la description de telle manière qu'une comparaison entre ces espèces et celles antérieurement établies soit possible. Ces descriptions doivent être formulées suivant certaines règles. En ce qui concerne les essais de culture nécessaires, il importe de se servir, autant que possible, des mêmes liquides nutritifs et d'en choisir qui soient facilement accessibles. Je vais maintenant passer en revue les caractères les plus importants au moyen desquels nous pouvons distinguer les espèces les unes des autres; il est vrai que pour ce qui regarde les Saccharomycètes, ces caractères sont peu nombreux.

Formation de spores. Comme on le sait, le critérium décisif pour vérifier si une levure quelconque doit être rangée dans la famille des Saccharomycètes ou non, est le pouvoir de former des endospores. Hansen nous a appris quelles sont les conditions nécessaires à la sporulation. Les voici: On commence par ensemencer une végétation jeune et vigoureuse sur un bloc de plâtre, que l'on place à une température favorable — habituellement 25° —, dans de l'eau stérilisée où l'air a accès. La végétation choisie doit préférablement avoir été engendrée dans du moût de bière; toutefois, des recherches plus récentes ont démontré qu'il peut parfois être nécessaire d'avoir recours à un autre liquide et à une autre température. Que dans certains cas une addition de dextrose au moût puisse avoir une influence favorable sur le pouvoir de produire des spores, Hansen nous l'a montré pour le Saccharomycodes Ludwigii; quant à moi, j'ai fait la même observation pour le Saccharomyces Marxianus. Dans les recherches précédemment relatées sur quelques espèces de Pichia, j'ai constaté que parmi celles-ci il y en a qui ne peuvent produire de spores qu'après avoir été cultivées préalablement dans l'eau de levure additionnée de dextrose, et qui n'en produisent pas après culture en moût; pour observer la sporulation chez le Pichia alcoholophila, il m'a fallu ajouter préalablement de l'alcool au moût destiné à produire la végétation pour les blocs de plâtre, parce que, sans cela, on

n'obtient qu'un développement excessivement faible ou même aucun. Ainsi donc, quand une culture dans le moût, suivie d'un séjour du bloc de plâtre à la température de 25°, ne donne pas de spores, il faudra essayer de la température du laboratoire (15° environ), et si même alors la sporulation ne se produit pas, on devra opérer la culture dans l'eau de levure additionnée de dextrose, pour placer ensuite les blocs de plâtre et à la température de 25° et à celle du laboratoire (15°). En règle générale, pour qu'une culture produise des spores, une température au-dessous de 25° est préférable à une température plus élevée[1]). C'est sans doute à tort que bon nombre de Saccharomycètes ont été classés dans les genres Torula et Mycoderma, pour n'avoir pas été examinés quant à leur pouvoir de former des spores. C'est ainsi que, pour essayer à ce point de vue ses «Kahmhefen», Meissner[2]) abandonnait les blocs de plâtre à une température de 30° et, dans le cas où dans l'espace de dix jours la sporulation ne se produisait pas, il croyait pouvoir admettre que les espèces soumises à cette température n'étaient point capables de former des spores. En fait, la température de 30° est dans bien des cas peu favorable à la formation de spores.

Mes recherches sur le Zygosaccharomyces Priorianus Klöcker m'ont prouvé qu'il est également recommandable d'essayer de placer les blocs de plâtre dans du moût au lieu de les placer dans l'eau. Enfin, il convient aussi d'examiner au point de vue de la sporulation, des colonies cultivées sur du moût gélatiné, additionné ou non d'agar. C'est seulement après qu'une levure aura été essayée et éprouvée de toutes ces diverses manières que, sur la base des données acquises jusqu'à présent, on sera à même de se prononcer sur la question de savoir si elle produit des spores ou non.

Comme on le sait, il arrive souvent que dans le courant des années le pouvoir des Saccharomycètes de former des spores se perd, ou du moins subit une forte diminution. Jusqu'à ce jour il n'existe aucune méthode permettant de faire recouvrer ce pouvoir une fois perdu. Au laboratoire de Carlsberg nous avons

[1]) Exception faite pour les deux nouveaux genres établis par moi: le Schwanniomyces et le Debaryomyces, chez lesquels la température optimale de la sporulation paraît être située à 30°, ce qui cadre bien avec ce fait qu'ils sont originaires des Indes occidentales.

[2]) Landw. Jahrb., 1901.

fait, ces dernières années, des travaux assez étendus sur ce sujet, mais sans pouvoir réussir. Lorsque le pouvoir de produire des spores est considérablement diminué, une sélection des cellules peut souvent donner des chances d'obtenir une végétation ayant conservé intact ce pouvoir. Dans le but de faire cette sélection, il est bon de disséminer des cellules sur du moût gélatiné, soit en partant de la culture telle quelle pour en essayer plus tard quelques colonies, soit après l'avoir fait dessécher sur du coton, puis séjourner longtemps à la température de 15°. Dans ce dernier cas, en effet, pourvu que la dessiccation ait été prolongée pendant un temps suffisamment long, ce sont les quelques spores développées qui se maintiendront en vie, et elles fonderont de nouvelles végétations douées d'un pouvoir héréditaire de sporulation.

Il convient de faire remarquer encore que, lorsqu'on veut isoler une espèce faisant partie d'un mélange, il sera généralement recommandable de ne pas se contenter d'en isoler une cellule seule, mais d'en extraire plusieurs pour examiner quant à la sporulation chacune des végétations auxquelles elles donneront naissance. Car, en isolant une cellule unique, il peut arriver que le choix tombe sur une cellule ayant un pouvoir de sporulation particulièrement faible, et on peut même courir aussi le risque de tomber sur une cellule asporogène. C'est pourquoi il convient toujours d'essayer plusieurs cultures issues de cellules uniques.

L'un des critériums les plus sûrs pour décider si l'on est bien réellement en présence de spores, consiste à observer la germination de la spore présumée. Nous en reparlerons plus loin.

La forme des spores peut être variable chez une même espèce. Il faut distinguer entre les spores jeunes et les vielles, attendu qu'avec l'âge la forme subit souvent des modifications (préparation à la germination et le gonflement qui en est la suite), et que les spores sont susceptibles de se souder en croissant. Un fait qui présente une certaine importance, c'est que les spores sont parfois garnies de protubérances de divers genres (Willia anomala Hansen, Willia Saturnus Klöcker, Schwanniomyces occidentalis Klöcker, Debaryomyces globosus Klöcker). Chez beaucoup d'espèces, les spores montrent au centre un globule fortement réfringent; c'est cette sorte de spores que P. Lindner appelle «Perlensporen». Chez les spores d'un certain nombre d'espèces, il en est ainsi déjà lorsqu'elles sont

encore jeunes, tandis que d'autres ne font voir ce phénomène que lorsque la spore a vieilli.

Germination des spores. Le plus sûr moyen d'arriver à constater si des formations endogènes quelconques sont réellement des spores ou non, c'est d'en observer la germination. Toutefois, cette observation comporte une certaine difficulté, étant donné que, en général, aussi longtemps qu'elles se trouvent en compagnie de cellules végétatives, les spores ne germent pas. Il est souvent fort malaisé d'arriver à isoler une cellule sporogène lorsqu'il ne s'en est formé qu'en nombre minime. La «Tröpfchenkultur» de P. Lindner en chambre humide est le moyen le plus facile d'y parvenir; toutefois il arrive alors fréquemment que néanmoins on ne réussit pas à faire germer les spores, même s'il ne se trouve pas en même temps de cellules végétatives dans la gouttelette. Comme liquide nourricier, il est bon d'employer du moût étendu d'eau, milieu dans lequel la germination se produit assez souvent plus facilement que dans du moût pur.

Les températures limites entre lesquelles a lieu la formation des spores ont aussi une grande importance pour la détermination de l'espèce, bien qu'à un degré moindre que celles du bourgeonnement. En effet, le bourgeonnement se trouve toujours chez les espèces, tandis que, comme on le sait, le pouvoir de former des spores peut se perdre ou tellement s'affaiblir avec le temps que, de ce fait, il devient excessivement difficile ou même tout à fait impossible de déterminer ces limites. Pour arriver à faire ces déterminations, il y a également lieu d'observer certaines précautions indispensables. Autant que faire se peut, on devra toujours faire usage de blocs de plâtre ordinaires et, avant de procéder à l'ensemencement, il pourra être nécessaire de porter le bloc aussi bien que l'eau à la température à laquelle la culture doit être examinée. Il est encore un fait que j'ai eu l'occasion de remarquer lorsque j'avais à déterminer les températures limites entre lesquelles la sporulation se produit chez le Pichia alcoholophila: à savoir qu'il faut s'assurer que, dans la végétation à ensemencer, il ne s'est pas déjà formé de spores. Il est vrai que ceci arrive très rarement; cependant, surtout parmi les espèces de Pichia, il y en a qui sont très disposées à former des spores dans le voile. En fait, dans un voile âgé de deux jours, qu'avait formé à la température ordinaire du laboratoire l'espèce ci-dessus nommée sur du moût

additionné d'alcool, j'ai aperçu pas mal de spores, et avant de cultiver sur bloc de plâtre mes voiles âgés de vingt-quatre heures en vue de leur faire produire des spores, il fallut les examiner bien soigneusement afin d'être sûr qu'ils ne contenaient ni spores, ni rudiments de spores. Pour ce motif, il est notamment important de chauffer au préalable le bloc de plâtre et l'eau, puisque sans cela les rudiments pourront, dans les premières heures, se développer en spores.

On détermine la forme des cellules en les observant dans une jeune culture — âgée de vingt-quatre heures — engendrée dans du moût de bière, si l'espèce en question peut y croître; sinon, il faudra recourir à quelque liquide nutritif plus favorable. La végétation à ensemencer devra provenir d'une génération engendrée par une succession rapide de cultures, de telle manière qu'on ne vienne pas à semer des cellules vieilles. La végétation ainsi obtenue devra être cultivée à la température ordinaire du laboratoire (15^0) ou à 25^0. En général, les cellules présenteront essentiellement la même forme à ces deux températures; dans le cas contraire, il faudra en prendre note. En tous cas, il faut toujours indiquer la température employée. Ensuite, on observera la forme cellulaire au voisinage des températures limites de la croissance végétative. C'est surtout la forme observée aux environs du maximum qui est souvent caractéristique. Hansen a montré que, sous ce rapport, les espèces peuvent se ranger dans deux catégories, selon que les cellules acquièrent une tendance à affecter la forme plus ou moins courte, sphérique, ou bien à s'allonger. Au cas qu'une forme cellulaire particulièrement caractéristique apparaisse sur d'autres milieux que le moût, il faudra naturellement l'indiquer expressément.

Les températures limites de la croissance végétative doivent également, autant que possible, être déterminées dans le moût, en y semant des cellules jeunes et vigoureuses en quantité si faible que la végétation ensemencée ne soit pas visible. C'est pourquoi il faudra dans ce but se servir d'un moût parfaitement limpide, sans dépôt, et l'ensemencement ne devra s'opérer que lorsque ce moût aura pris la température à laquelle l'examen devra se faire. Vu que dans du moût abandonné au repos il se forme toujours un dépôt, il sera nécessaire d'enlever au moyen d'une pipette le liquide surnageant et de le mettre dans un autre flacon stérilisé, afin de l'avoir bien limpide et

débarrassé du dépôt. Après avoir été abandonnés à eux-mêmes pendant un certain temps — quelques (3) jours seulement aux températures élevées, aux températures basses, deux à trois mois, — les flacons ensemencés sont soumis à l'examen. Un développement visible à l'œil nu s'est-il produit, la question est vite tranchée; dans le cas contraire, il est souvent fort malaisé de dire avec certitude si une légère multiplication a eu lieu. En pareil cas, il faudra décanter avec précaution le liquide surnageant et n'en laisser qu'une couche mince. Après l'avoir bien agité, on en prélèvera un échantillon que l'on examinera au microscope pour voir si un bourgeonnement s'est produit. Dans le cas où il sera impossible de l'apercevoir avec certitude, on devra avoir recours aux chambres humides et marquer un certain nombre de cellules. Ces chambres devront être placées sur la platine d'un microsope, laquelle devra pouvoir être chauffée.

Pour ce qui concerne les espèces à formation rapide de voile (Pichia, Willia), les températures limites de cette formation pourront servir de caractère. Il faut bien ne pas perdre de vue que le voile ne se produit pas toujours dans les mêmes limites que le bourgeonnement. Ainsi que cela a été démontré par Hansen, il arrive très fréquemment qu'au voisinage de leurs températures limites, les Saccharomycètes que je viens de citer ne forment que de la levure de dépôt, sans qu'on remarque la moindre apparence d'un voile; c'est ainsi que près du minimum il peut se produire un notable développement de levure de dépôt sans aucune formation de voile.

Formation de voile. Nous avons vu dans ce qui précède que, lorsqu'il s'agit de déterminer si telle espèce appartient à l'un ou à l'autre des genres Pichia et Willia, et que, ensemencée sur du moût, elle n'a pas formé de voile, il est nécessaire de la semer sur du moût additionné d'alcool ou, s'il y a lieu, aussi sur la double bière, de même que dans de gros ballons largement approvisionnés d'air.

Pour observer la formation de voile chez les autres genres de Saccharomycètes, il est recommandable, en se conformant aux prescriptions très précises de Hansen, d'opérer des ensemencements dans du moût, préférablement dans des ballons Pasteur, puis de laisser ceux-ci à un repos prolongé. L'aspect que présentent les cellules des vieux voiles peut fournir un caractère précieux.

Colonies gigantesques. Les caractères tirés de l'aspect des colonies gigantesques sont souvent susceptibles de variations assez fortes. Ici il est à recommander de s'attacher à suivre les indications de Lindner prescrivant d'ensemencer avec précaution sur la surface d'un moût solidifié à 10 % de gélatine, une petite goutte d'une végétation jeune et vigoureuse engendrée dans du moût. On abandonne les cultures à la température du laboratoire pendant un mois environ. Il est indispensable de mener plusieurs cultures de front, afin de découvrir, en les comparant les unes avec les autres, ce que leur aspect a de commun et de caractéristique. Dans la plupart des cas, les colonies gigantesques fournissent seulement des caractères de groupes, et non des caractères spécifiques. Je n'ai pas utilisé ces caractères dans les descriptions qu'on vient de lire; mais la forme qu'affectent les cellules dans ces colonies peut cependant parfois en fournir un d'une certaine importance pour la description d'une espèce quelconque.

Action sur les sucres dextrose, lévulose, saccharose et maltose, éventuellement lactose et galactose. Dans le but de déterminer cette action, qui présente une si grande importance, on sème une quantité abondante d'une végétation jeune et vigoureuse dans de l'eau de levure additionnée de 10—15 % du sucre en question, lequel doit nécessairement être parfaitement pur. Si alors, à une température de 25°, on aperçoit des phénomènes de fermentation dans la solution, la chose est bien vite tranchée; dans le cas contraire, on est obligé de procéder à une analyse au point de vue de la teneur possible en alcool, analyse qui peut s'effectuer suivant une modification, indiquée par moi, de la réaction par gouttelettes de Pasteur[1]). C'est que, en effet, il existe des espèces qui ne peuvent fermenter que des quantités extrêmement minimes d'un sucre, de telle sorte que la fermentation ne se manifeste pas et ne peut être constatée qu'en démontrant la présence d'alcool formé souvent en proportion excessivement faible. Dans le mémoire cité j'ai signalé que l'eau de levure donne quelquefois avec le temps naissance à de petites quantités d'alcool. Par suite, l'examen du liquide au point de vue de sa teneur possible en alcool doit toujours être effectué immédiatement après l'ensemencement.

Lorsqu'il s'agit de rechercher l'invertine que peuvent con-

[1]) Comptes-rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg, **10**, 99 (1911).

tenir les cellules d'une espèce quelconque, il convient de procéder comme suit: Après avoir trituré avec du sable dans un mortier une portion de levure lavée, on verse toute la matière dans une solution aqueuse à 10 % de saccharose additionnée d'un peu de toluène afin de prévenir tout développement de bactéries. On abandonne le tout à la température de 50°, et déjà au bout de quelques heures on verra la liqueur réduire la solution de Fehling, si les cellules contiennent de l'invertine. Plus souvent cependant, il suffira de semer la levure examinée dans de l'eau de levure additionnée de 10 % de saccharose pour laisser séjourner à la température de 25°; mais il est des espèces où l'action de la zymase suit la formation de sucre interverti, en sorte que ce dernier subit la fermentation au fur et à mesure qu'il prend naissance, et, en pareil cas, on n'obtiendra donc pas la réduction de la solution Fehling. Vu que dans ces cas-là, on peut démontrer la présence d'alcool dans le liquide, on serait tenté de croire qu'une fermentation directe du saccharose avait lieu, ce qui pourtant n'est point le cas pour les Saccharomycètes connus à ce jour.

L'essai sur la solution de Fehling s'opère le plus convenablement par le procédé que voici:

On prépare les deux solutions suivantes:

I.

Hydrate de sodium.....	19 gr.
Sel de Seignette	52 -
Eau	150 -

II.

Sulfate de cuivre	10 gr.
Eau	150 -

Après avoir mis dans un petit creuset en porcelaine deux cc. de la solution I et une dose égale de la solution II, on les mélange ensemble, puis on chauffe — au moyen d'une petite flamme — jusqu'à apparition des premières bulles d'air, pour écarter ensuite la flamme et ajouter au mélange un cc. de la solution à examiner sous le rapport de sa teneur en sucre réducteur. Après repos (jusqu'au lendemain, lorsqu'il s'agit de petites quantités de sucre interverti), on procède à l'examen du contenu du creuset, et l'on pourra alors voir le cuivre réducteur au fond

du creuset. Cette méthode donne une réduction bien nette pour une teneur de 0,1 % en dextrose dans l'eau de levure; pour 0,025 %, on obtient du cuivre réducteur en quantité si minime, que c'est à peine si on peut le voir.

Il serait certainement à désirer que l'on pût arriver à formuler les descriptions de Saccharomycètes d'une manière permettant d'en identifier les diverses espèces. J'aime à croire qu'en s'attachant à suivre les voies indiquées dans ce qui précède, on pourra y parvenir.

En février 1912.

EXPLICATION

DE LA

TABLE I.

Grossissement de 500 fois pour toutes les figures.

Fig. 1. Pichia suaveolens n. sp. Cellules provenant d'un jeune voile formé sur moût à 25°.

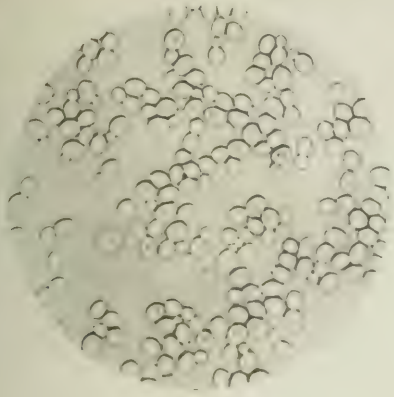
— 2. Pichi alcoholophila n. sp. Cellules provenant d'un jeune voile sur moût additionné d'alcool, à 25°.

— 3. Même espèce. Asques renfermant des spores et des cellules végétatives provenant de colonies gigantesques sur moût gélatiné.

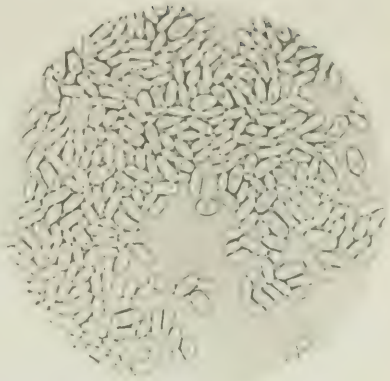
— 4. Pichia polymorpha n. sp. Cellules d'un jeune voile sur moût à 25°.

— 5. Même espèce. Cellules d'un jeune voile sur moût à 36°.

— 6. Pichia calliphoræ n. sp. Cellules d'un jeune voile sur moût à 25°.

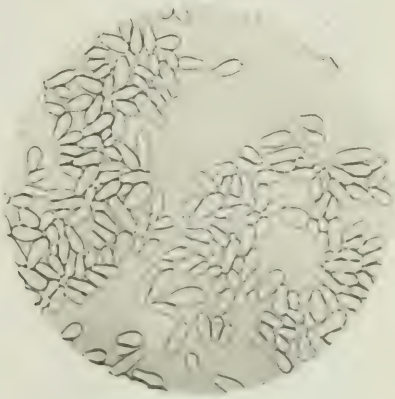


1



2

3



4

5

6

SUR L'EMPLOI DE L'EXTRAIT DE CHOUX ROUGE COMME INDICATEUR DANS LA MESURE COLORIMÉTRIQUE DE LA CONCENTRATION DES IONS HYDROGÈNE.

PAR

L. E. WALBUM.

(Travail fait à l'Institut de Sérum de l'État danois et au Laboratoire de Carlsberg).

Dans la mesure colorimétrique de la concentration des ions hydrogène, ce sont les matières protéiques et leurs premiers produits de décomposition qui donnent lieu aux plus fortes erreurs, et dans bien des cas la présence de ces corps se fait sentir si fortement, que la mesure colorimétrique en est rendue tout à fait impossible. D'après S. P. L. Sørensen [1]) cela tient probablement au fait que les protéines aussi bien que nombre de réactifs indicateurs les plus complexes sont de nature colloïdale, d'un côté, et, de l'autre, au caractère amphotère des protéines, caractère qui a pour conséquence qu'elles peuvent s'unir tant aux colorants basiques qu'aux colorants acides, et, comme ces combinaisons ont souvent une teinte qui leur est propre, il s'en suit évidemment que dans ces conditions la comparaison colorimetrique n'est souvent pas possible. Toutefois, tous les indicateurs ne sont pas influencés au même degré par les substances protéiques; un groupe qui l'est tout particulièrement est formé par ceux, très nombreux, qui appartiennent aux corps azoïques, et qui se rapportent à l'important domaine de concentrations en ions hydrogène allant de $p_H^+ = 1{,}2$ à $p_H^+ = 5{,}7$.

Ce sont des considérations de cette nature qui attirèrent mon attention sur ce fait que dans la nature des protéines se trouvent

[1]) Comptes-rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg, **8**, 1 (1909). Etudes enzymatiques II.

souvent en présence de solutions très concentrées de matières colorantes, ainsi qu'on peut le constater dans bon nombre de cellules végétales dont le suc cellulaire est coloré. Dans les cellules comme, par exemple, celles du choux rouge qui renferment de la matière colorante, celle-ci se trouve à l'état dissous dans le suc cellulaire, et ce dernier remplit souvent la plus grande partie du centre de la cellule, tandis que le protoplasma tout à fait incolore l'enveloppe et revêt les parois. Du fait que le protoplasma de ce genre de cellules est entièrement incolore, on pouvait admettre que la matière colorante dont le suc cellulaire est le véhicule n'est pas capable d'être absorbée par la protéine naturelle, ni même d'entrer en combinaison avec celle-ci; en tout cas, il n'y a pas formation de produits colorés.

Cet ensemble de faits m'amena à penser que précisément une pareille matière colorante pourrait peut-être s'employer avantageusement comme indicateur dans les déterminations de la concentration en ions hydrogène des liquides renfermant des protéines, pourvu toutefois qu'elle se trouvât être douée des autres propriétés absolument nécessaires à tout indicateur: c'est-à-dire qu'elle devait produire un virage suffisamment marqué; que, abandonnés à eux-mêmes pendant quelque temps, les mélanges expérimentés ne devaient pas changer de teinte, et que les résultats de la mesure ne devaient pas être sensiblement influencés par la présence du toluène, du chloroforme ou des sels neutres.

Préparation de l'indicateur. A la température ordinaire du laboratoire, on traita, en remuant fréquemment, 500 gr. de choux rouge finement coupé par une quantité égale d'alcool à 96° o, ce qui amena, au bout de deux jours, la dissolution presque entière du colorant bleu violet; après filtration au travers de papier, l'indicateur était prêt à servir.

Comme il était à supposer qu'un tel extrait renfermait plusieurs substances colorantes, je cherchai à les en isoler de diverses manières: En extrayant au moyen de l'éther l'extrait alcoolique évaporé à siccité dans le vide, je réussis à isoler un colorant vert (chlorophylle) soluble dans l'éther; le résidu traité par l'alcool à 96 % — qui fit dissoudre le colorant bleu violet —, laissa un reste partiellement soluble dans l'eau, à laquelle il donnait une couleur rouge brunâtre pas très net. La solution alcoolique de colorant ainsi obtenue, montra cependant dans des milieux

acides un virage identique à celui que montre l'extrait originel; comme l'indicateur ne pouvait s'employer que dans les liquides acides, il paraissait donc qu'il n'y avait rien de gagné par la séparation effectuée, et comme en outre les opérations faisaient perdre des quantités considérables de matière colorante, je crus raisonnable d'utiliser l'extrait primitif fortement coloré Et c'est cet extrait qui a servi aux essais que je vais maintenant relater.

Pour 10 cc. de liqueur expérimentée[1]) j'ai employé 5 à 10 gouttes de réactif indicateur.

Celui-ci a donné les virages ci-après:

	10 HCl	$p_H^+ = 1{,}04$	fortement rouge.
4 cit.	+ 6 —	$p_H^+ = 2{,}96$	—
5 -	+ 5 —	$p_H^+ = 3{,}96$	plus faiblement rouge.
7 -	+ 3 —	$p_H^+ = 4{,}45$	— —
8 -	+ 2 NaOH	$p_H^+ = 5{,}32$	faiblem. rouge violet.
6 -	+ 4 —	$p_H^+ = 5{,}97$	bleu violet.
6 phosph. sec.	+ 4 phosph. prim.	$p_H^+ = 6{,}98$	faiblement vert bleu.
9 —	+ 1 —	$p_H^+ = 7{,}65$	fortement vert bleu.
9,5 glycine	+ 0,5 NaOH	$p_H^+ = 8{,}58$	faiblement vert-jaune.
7 —	+ 3 —	$p_H^+ = 9{,}71$	fortem. jaune verdâtre.

On put constater que seules les teintes du côté acide du point neutre étaient suffisamment stables, et que leur stabilité était d'autant plus grande que les liquides étaient plus acides Les teintes aux alentours du point neutre se renforçaient assez vite par abandon; dans les liquides alcalins elles devenaient de plus en plus jaunes, et ce d'une façon d'autant plus rapide et plus prononcée que le liquide était plus alcalin.

Des mesures minutieuses établirent, que l'indicateur était utilisable pour les concentrations en ions hydrogene allant approximativement de $p_H^+ = 2{,}0$ à $p_H^+ = 4{,}5$, la couleur faiblement rouge à $p_H^+ = 4{,}5$ augmentant d'intensité à mesure que p_H^+ diminuait jusqu'à $p_H^+ = 2{,}0$, limite au-dessous de laquelle la teinte ne se renforce plus. Les nuances obtenues aux concentrations ioniques comprises entre ces limites, se montraient généralement fixes durant plusieurs heures, et au-dessous de $p_H^+ = 3{,}5$ env. elles se maintenaient même jusqu'au lendemain.

[1]) Voir «Etudes enzymatiques II», p. 61.

En vue de rechercher si l'indicateur pouvait servir pour les mesures des solutions contenant des substances protéiques, j'entrepris les essais résumés ci-dessous, qui se rattachent, d'une façon générale, à ceux communiqués dans les «Études enzymatiques II» de S. P. L. Sørensen et portant sur des questions analogues.

Composition des solutions examinées	Coloration des liqueurs de comparaison	P_H^+		
		Trouvé par électrométrie	Trouvé par colorimétrie	
			Extrait de choux rouge	Autres indicateurs
Solution à 4 % d'albumine d'œuf	Hélianthine II	4,02	4,08	α-Naphtylamino-azo-benzène 4,44.
De même	De même	2,76	2,77	
Solution à 2,5 % de sérum de cheval	Hélianthine II Brun Bismarck	3,45	3,55	Méthylorange > 4,4 en dehors du virage.
Solution à 25 % de sérum de cheval	De même	2,31	2,42	Acide benzylanilino-azo-p-benzène sulfonique — la matière colorante disparaît tout à fait.
De même	De même	3,71	3,85	α-Naphtylamino-azo-benzène et acide diméthylanilino-azo-benzène-sulfonique — les matières colorantes disparaissent tout à fait.
Solution à 2 % de peptone Witte	Hélianthine II Brun Bismarck Violet de méthyle	2,93	3,05	Diméthylanilino-azo-benzène : 3,14.
Solution à 2 % de colle gélatine	Hélianthine II Brun Bismarck	2,20	2,13	
Solution chlorhydrique d'acidalbumine ; 1 cc. renferme $0^{mgr.},95$ d'azote	Hélianthine II $BaSO_4$	1,99	2,03	Benzylanilino-azo-benzène > 3,3 en dehors du virage.
De même	De même	2,61	2,56	De même.
Solution chlorhydrique de caséine ; 1 cc. renferme $3^{mgr.},14$ d'azote	De même	2,47	2,34	De même.

Ainsi qu'il ressort de ce tableau, les valeurs obtenues colorimétriquement concordent sensiblement avec celles trouvées par la voie électrométrique. —

Voulant examiner comment cet indicateur se comporterait vis-a-vis des sels neutres, j'ai procédé aux quelques essais réunis ci-après:

Composition des solutions examinées	p_H^+ trouvé par	
	électrométrie	colorimétrie
4 citrate + 6 HCl + 1/1 mol. NaCl	2,66	2,66
9 glycine + 1 HCl + 1/1 mol. NaCl	3,31	3,18
Solution à 4 % d'albumine d'œuf + HCl + 1/1 mol. NaCl	4,30	3,96
Egalement, seulement avec 1/2 mol. NaCl . . .	4,32	4,26

On voit donc que dans les liquides exempts d'albumine, même une proportion de chlorure de sodium correspondant à la concentration 1/1 molaire ne donne pour ainsi dire pas lieu à une «erreur de sel», tandis que dans les liquides contenant de l'albumine il n'en est plus de même; toutefois, même dans ce dernier cas, on obtient avec la concentration 1/2 molaire des valeurs qui s'accordent avec celles que donne la mesure électrométrique, en sorte que, cette concentration étant notablement supérieure à celle que présentent généralement les liquides physiologiques, l'erreur de sel n'est point suffisamment grande pour entraver l'emploi de l'indicateur dans les recherches biologiques en général.

Dans ses «Etudes enzymatiques II», S. P. L. Sørensen a constaté que, lors de l'emploi de certains indicateurs, une teneur en toluène ou en chloroforme peut souvent donner lieu à des mesures entachées d'erreurs. Vu l'utilisation très fréquente de ces substances comme agents de conservation dans les recherches biologiques, j'ai effectué quelques petits essais ayant pour but d'établir si l'indicateur de choux rouge est utilisable dans ces conditions.

Après avoir mesuré une forte quantité du mélange «4 citrate + 6 HCl», j'en ai employé une portion (A) telle quelle, tandis qu'une autre portion (B) a été secouée en présence d'un excès de toluène et une troisième portion (C) en présence de chloroforme. Mesurés à l'aide de l'extrait de choux rouge comme indicateur, les trois mélanges donnèrent $p_H^+ = 2.96$, résultat qui s'accorde parfaitement avec celui de la mesure électrométrique.

Une quantité notable d'une solution à 4 % d'albumine d'œuf, additionnée d'acide chlorhydrique, a été soumise au même traitement, et la mesure au moyen de l'extrait de choux rouge donna les valeurs suivantes de p_H^+:

A = 4,16 (par électrométrie: 4,12)
B = 4,32
C = 4,40.

Comme il était à supposer que la cause des valeurs un peu plus élevées de B et de C tenait à ce que le toluène et le chloroforme auraient donné lieu à une extraction de certains corps acides, j'ai effectué un essai analogue afin de vérifier l'exactitude de cette hypothèse. Dans cet essai j'ai déterminé la concentration ionique de B et de C non seulement par colorimétrie, mais aussi par électrométrie, et pour éliminer toute trace de toluène et de chloroforme, avant d'opérer les mesures, j'ai fait traverser ces mélanges, durant la nuit, par un courant d'hydrogène.

Voici le résultat de cet essai:

	Mesure électrométrique	Mesure colorimétrique (choux rouge)
A	4,04	4,08
B	4,29	4,32
C	4,27	4,25.

L'hypothèse avancée ci-dessus se trouve donc être juste: notre indicateur donne des mesures exactes même en présence de toluène et de chloroforme.

Conclusions:

Dans le colorant rouge violet du choux rouge, nous avons un indicateur qui dans la mesure colorimétrique de la concentration des ions hydrogène donne des valeurs s'accordant fort bien avec celles trouvées par voie électrométrique. Cet indicateur est utilisable pour les concentrations ioniques comprises entre $p_H^+ = 2,0$ et $p_H^+ = 4,5$ approximativement.

Même en présence d'une forte teneur en protéines naturelles, acidalbumines *etc.*, l'indicateur donne des résultats satisfaisants.

Les sels neutres (jusqu'à NaCl $^1/_2$ mol.), le toluène et le chloroforme, n'influent pas sur le résultat de la mesure.

En octobre 1912.

INVESTIGATIONS ON HOPS
(*Humulus lupulus*, L.).

In the year 1910 the Physiological Department of the Carlsberg Laboratory began a series of investigations on hops (*Humulus lupulus*, L.), with a view to obtaining information of theoretical and practical interest regarding this plant.

These investigations will probably extend over some time and in various directions and it will therefore be most natural to publish the results as they gradually come to hand.

The present report on the growth in length of hop-stems is published as the first contribution to «Investigations on hops (*Humulus lupulus*, L.)».

Carlsberg Laboratory Dec. 15th 1912.

JOHS. SCHMIDT.

I. THE GROWTH IN LENGTH OF HOP-STEMS AND ITS DIURNAL PERIODICITY.

BY

JOHS. SCHMIDT.

With 4 figures in the text, 3 tables and 3 Plates.

1. Introduction.

THE inducement to the present investigations was found in some measurements made in 1911 on the growth in length of various native and foreign hops. In the experimental garden at the Laboratory numerous hops of different origins are being cultivated and the object of the measurements has been, to ascertain if the improved «sorts» of cultivated hops from southern regions have a different rate of growth in our northern climate from our wild-growing plants, which possibly are better suited to the climate. In these measurements, which however have not been brought to a conclusion as yet, it appeared of interest to study more closely the daily growth in length of the hop-stem. This was done in the summer of 1911 and the spring and summer of 1912 and it is the result of this investigation that will be dealt with in the following.

2. The observations.

To begin with the growth in length was measured at wide intervals e. g. 1 or 2 days. As, however. I found a considerable growth, e. g. 15—20 cm. during a day and night, measurements were made at shorter intervals and after some preliminary experiments they were repeated every 6th hour. The measurements were now carried out at 6 a. m., 12 noon, 6 p. m. and 12 midnight.

The method employed was very simple, a small piece of bast, an inch-scale, a note-book with pencil and at night an

electric pocket-lamp being all that was needed. Only the growth in length of the main stem was measured. The experimental plants were growing upward on vertical wires 1 mm. in diameter. The stem winding itself round the wire clings so fast thereto, that there can be no question of its slipping down and thereby disturbing the correctness of the measurements.

In the measurements the following method was adopted: at 12 noon, for example, a short string of bast was knotted to the wire on a level with the tip of the stem. This point on the wire was found by straightening out the upper part of the stem and bending it towards and parallel with the wire. This proceeding was repeated, e. g. at 6 p. m., and the distance between the two pieces of bast on the wire thus showed the growth in length during the 6 hours.

As will be seen, the method is very simple, but it does not claim great accuracy. I consider the error to lie within 5 mm., thus giving an accuracy which is quite sufficient owing to the, generally, very considerable growth we are dealing with. The greatest danger of errors of any importance lies in this, that the bast marking the growth may slip on the wire if pains are not taken to tie it very securely. I dare not affirm that this may not sometimes have happened, though great care has been taken to avoid this source of error. The results obtained, which are in good correspondence, show however, that the method has been quite good for the present purposes, and it is just owing to its great simplicity that the measurements could be carried out on a much greater scale than if automatic growth measurers had been used.

3. On what is the rate of growth dependent?

A. Preliminary investigations.

The first preliminary measurements in June 1911 showed already that a given hop-stem has not the same growth during several equally long periods. By measuring 3 different plants at intervals of 24 hours the following growths in mm. were obtained:

	June 25th	26th	27th	28th	29th	30th
Plant No. 1.....	183	137	101	169	119	
Plant No. 2.....	135	114	86	140	79	
Plant No. 3.....	67	59	44	66	43	

Thus, the growth of the plant has been extremely different during the different periods of 24 hours and this alone indicates, that it is the influence of outer factors and not qualities inherent in the plant which cause these variations. This is still more evident on comparing the results obtained for the three plants. For, even though they are by no means identical for the three plants — on the contrary, the differences point to individual differences in the plants — the actual growth is however so distinct, when the different periods are compared, that there can be no doubt that the figures obtained must in the main be the result of the same outer influences. An even clearer impression of this is obtained from fig. 1, which gives a graphic representation of the growth of the 3 plants. It leaves no doubt that these plants growing side by side must all have been influenced by the same outer factors.

Of the outer factors that would come into consideration under natural conditions, attention must be paid to the light, the humidity and the temperature of the air. Now it has been found that the light exercises its influence with increasing intensity to the detriment of the growth of the plant, while an increase of the two other factors, though for the latter only within certain limits, tends to hasten the rate of growth.

The question was now, to investigate which of the 3 factors have under natural conditions the greatest influence on the rate of growth.

It must be observed that all the plants examined were vigorous, deeply rooted specimens, none of them pot-plants. The soil was of the same quality for all the experimental plants; the same was the case with its amount of moisture, which was such, that the plants were kept turgescent during the whole experiment. The plants examined grew partly inside a glass-house built in the experimental garden at the Laboratory for experiments on hops cultivation, partly outside. During the greater part of the experiment the windows as well as the doors of the house were kept open. The plants generally had a height of 1—2 m. when measurements were begun. In several cases these were continued until the plant had reached a height of ca. 4 m.

When measurements were begun I had no idea which of the three above-mentioned, outer factors had the dominant in-

fluence on the rate of growth. I felt inclined to believe, that the growth must be strongest during the night and in order to

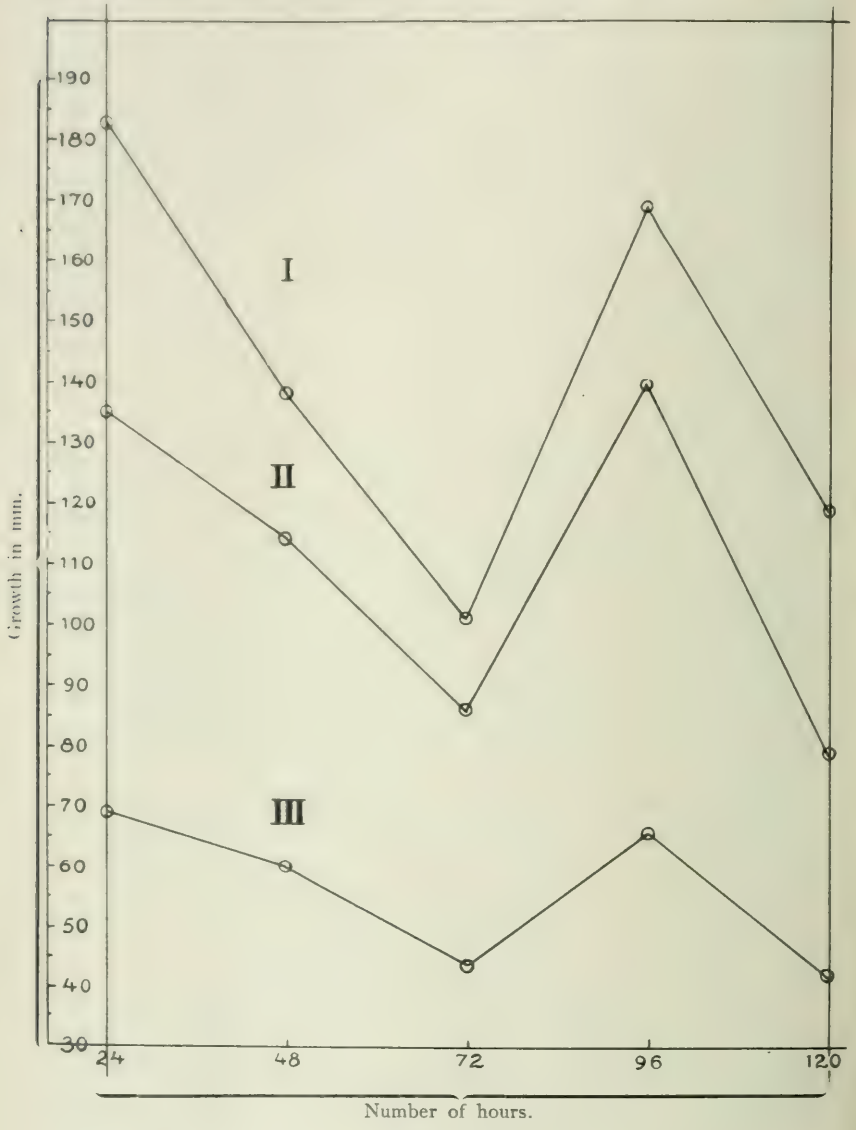


Fig. 1.

ascertain this I made a continuous series of measurements at intervals of 6 hours in the first week of July 1911. The measurements were carried out at 9 and 3, in order to be able to compare the darkest 6 hours period (9 p. m.—3 a. m.) with the other,

lighter periods. Sunrise was by that time at ca. 3. 30 and sunset at ca. 8. 45.

Measurement of 2 plants gave the following results (growth in mm.).

	Plant No. 1	Plant No. 2.
3 — 9 (afternoon)	55	42
9 — 3 (night)	27	19
3 — 9 (forenoon)	32	27
9 — 3 (day)	48	36
3 — 9 (afternoon)	57	42

These results are represented graphically in fig. 2.

It is seen from the above numbers and figure, that my supposition that the rate of growth was strongest during the six darkest hours of the 24 proved to be uncorrect. On the contrary, the smallest growth was observed during these 6 hours (9 p. m.—3 a. m.), which proves that darkness, the promoting factor of growth, has not been the dominant one, but that one or several other factors must have been more powerful. It might now be expected, that the growth-promoting power of darkness would first show itself as an «after-influence» and that the greatest growth therefore could only be expected during the following morning-period (3 a. m.—9 a. m.). The numbers show however that this is not the case. On the contrary, the strongest growth occurred during the period (3 p. m.—9 p. m.) immediately preceding the darkest period, the value for the rate of growth increasing evenly from the minimum of the latter period to the maximum of the afternoon period.

During the experiments no measurements were made of the other growth-promoting factor, the humidity. It is however generally known, that the relative humidity of the air is greatest during the hours of night, as also appeared from some later measurements given on Table III to which I may refer. In a similar way as for the first-mentioned. growth-promoting factor, the darkness, we may draw the conclusion, that the humidity cannot have been the dominant factor of the growth rate, the latter being smallest during that part of the 24 hours when the humidity is greatest; a small experiment mentioned later on p. 241 seems to point in the same direction.

It is otherwise with the third of the outer factors to be considered, namely, the temperature. No temperature observations were undertaken in connection with the measurements given in

fig. 2, but in the last week of June 1911 some temperature measurements were made. They were taken at intervals of 12 hours at 9 o'clock in one of the divisions of the glass-house, which was kept closed in order to get a great rise of temperature during the day-time by means of sun-light, and where a maximum and minimum thermometer was hung among the plants.

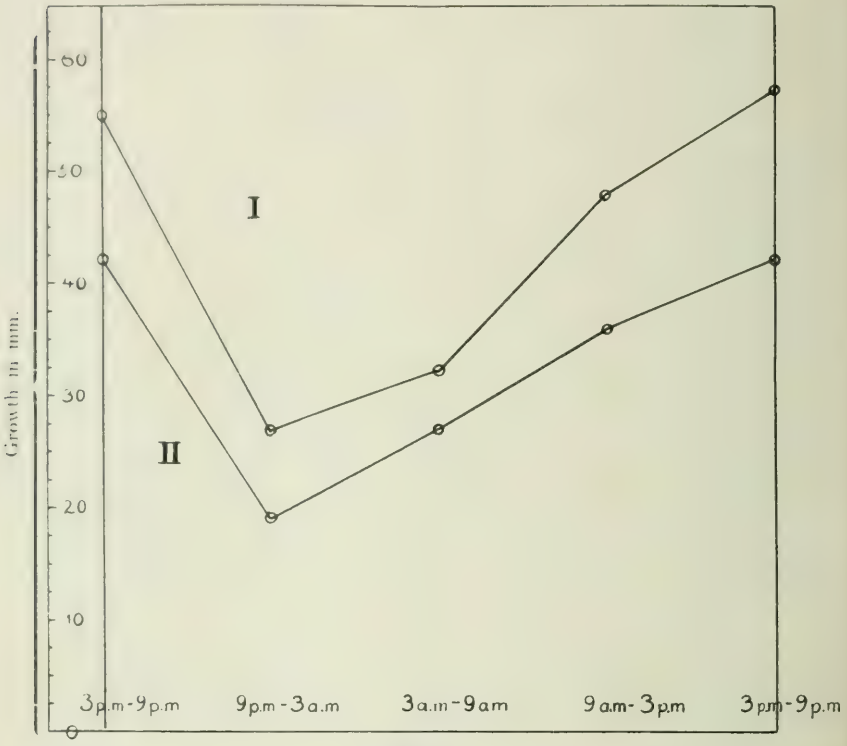


Fig. 2.

Measurement of 2 plants gave the following numbers (growth in mm.).

		Plant No. 1.	Plant No. 2.	Temperature maximum	Temperature minimum
June 26th	9 p.m.—9 a.m. (night)	70	65		16.5 ^{0}
	9 a.m —9 p.m. (day).	104	93	27 ^{0}	
June 27th	9 p.m.—9 a.m. (night)	68	50		15.5 ^{0}
	9 a.m.—9 p.m. (day).	95	74	25 ^{0}	
June 28th	9 p.m.—9 a.m. (night)	40	40		12 ^{0}
	9 a.m.—9 p.m. (day).	86	71	24 ^{0}	
June 29th	9 p.m.—9 a.m. (night)	55	48		14 ^{0}
	9 a.m.—9 p.m. (day).	116	102	29.5 ^{0}	

The results are represented graphically in fig. 3 below, on which also the maximum and minimum temperatures during the 12 hours periods in question are given. It is seen from the figure, that there seems to be a distinct connection between the temperature and the rate of growth, the latter being greatest during the periods when the temperature was highest, namely, in the day periods.

In this result lay a hint to make further investigations regarding the influence of the temperature on the rate of growth and thus, especially, to carry out temperature as well as growth measurements at shorter intervals.

More extensive investigations in this direction were then started and will be further mentioned here. First of all, however, I may mention that along with the just-mentioned, preliminary experiments on the influence of the temperature on growth, I tried to ascertain that of the humidity. This was done in the following way: on June 28th from 9 a. m. to 9 p. m. the division of the glass-house in which the experimental plants were growing, was at intervals sprayed with water from a turbine and another small rose, while all the doors and windows were kept closed. As far as possible the plants were not touched with the spray. As seen from the numbers and figure, the result was not that the rate of growth increased in any way during this period of unusually high humidity; on the contrary, it was less than during the other daily periods when the humidity of the air (the degree of moisture) was considerably lower (cf. Pl. III); it seems, therefore, that the continuous spraying with water and the evaporation caused thereby only had the effect of reducing the temperature and thereby also the rate of growth. At any rate the possible growth-promoting influence, which the increased humidity exercised on the plants has not been able to dominate the growth-inhibiting influence due to a reduction of temperature. I should have preferred to make some better and more comprehensive investigations on the influence of the humidity of the air, but from what has been shown here and at other places in the present paper, so much can probably be concluded that the influence of the temperature on the rate of growth under natural conditions predominates over the influence of humidity. During the experiments in 1912 when a thermohygro-

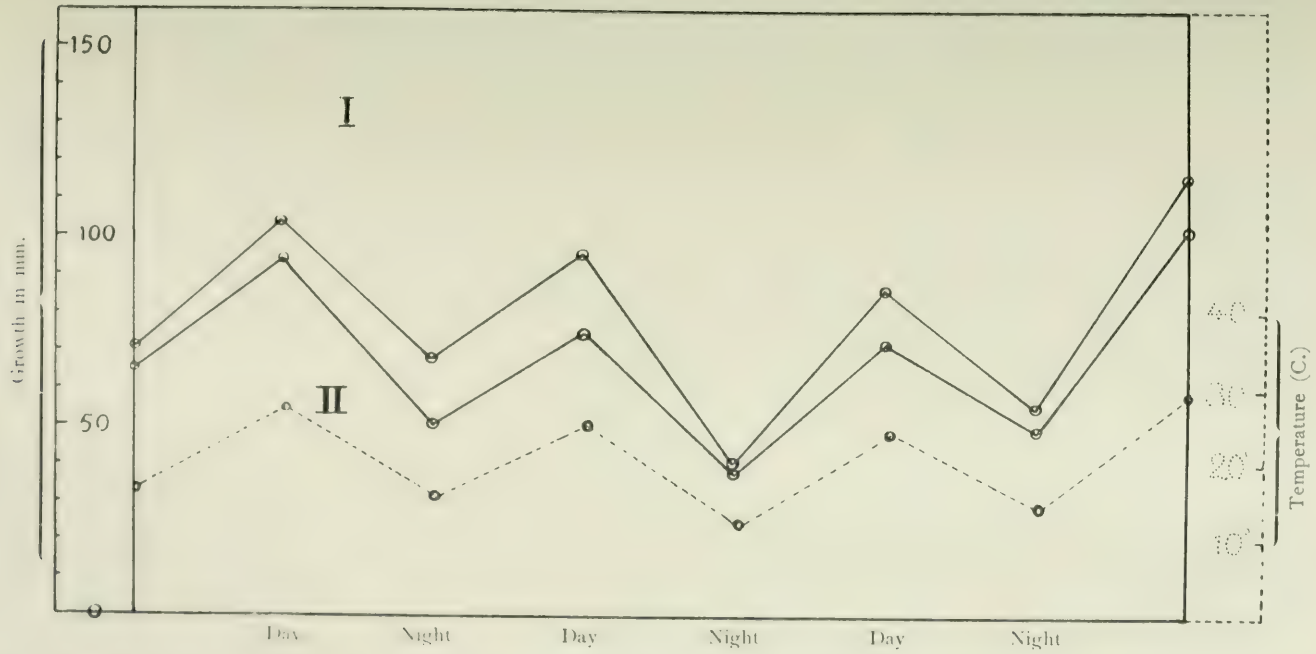


Fig. 3. The unbroken lines indicate the growth in mm. every 12 hours, the dotted one gives the maximum- and minimum temperatures during the day and night.

graph was used, further evidence on this question was obtained (see Pl. III).

After having described the preliminary measurements I may now proceed to discuss the true, main experiments. These fall in two periods, the first in July 1911, the other from the end of April to the end of June 1912. In both series the experimental plants were in the stage of vigorous growth which precedes the flowering. The plants were kept as far as possible under natural conditions; sometimes however the windows and doors of the glass-house, which was not artificially heated, were shut for shorter or longer periods, in order that the temperature might reach a higher point during the hours of the day than is generally the case in our climate.

During the months of the experiments, measurements were made continuously every sixth hour, namely at 6 in the morning, 12 noon, 6 afternoon and 12 night. They were carried out by myself, in 1911 with the assistance of the Laboratory custodian Mr. N. R. Poulsen and the Laboratory gardener Mr. Chr. Smith, in 1912 also by Assistant mag. scient. Ø. Winge. In working up the material assistance has been rendered by the latter.

B. Investigations in 1911.

The investigations began on July 6th and were continued without break till July 27th, on some plants still longer. To be able to follow the diurnal oscillations in temperature in the best possible manner during the whole time of the experiments, a thermograph was placed among the experimental plants at a height of 1—2 m. In this way we were able at any time, during the weeks the experiments lasted, to read off the temperature the plants had been exposed to.

A great number of plants were measured, namely ca. 40 in all. Apart from individual differences in the rate of growth, due mostly to unequal vigour of the different plants, the results were however in good agreement. It is superfluous therefore, to give the measurements of all the plants here, and I need only mention 4 of those which grew rapidly, though any of the other specimens examined might have shown the same.

The results of the measurements on the 4 experimental plants are given in the table on p. 249 and are represented graphically on Pl. I, where the vertical numbers give the growth in mm.,

the horizontal the time of day or night. The growth between 12 and 6 is given opposite 3 o'clock.

It will be seen at once, that there is a great agreement between the 4 experimental plants in the «course» of the growth, as they were all 4 surprisingly on a level with each other during the long period in which observations were made. Furthermore, the numbers show that the growth in length has quite a distinct diurnal period, being smallest during the night (from 12 night to 6 a. m.) and greatest during the day (from 12 noon to 6 p. m.). Finally, the numbers indicate that the rate of growth in the same period of the 24 hours may vary greatly from one day to another; this is seen very clearly for example, by comparison of the growth from 12 noon till 6 p. m. on July the 7th, 8th and 9th.

Besides the growth-curves of the 4 experimental plants the table also gives the curve of the thermograph while the plants were under observation. On comparing the temperature curve with the growth-curves, the scale of which has been chosen so that the points of time coincide with those of the temperature-curves, it is seen at once that there is quite an indisputable correlation in their course. When the temperature rises the rate of growth increases, when it sinks the rate of growth decreases, and this is not only the case within one diurnal period, but holds good also when several days and nights are compared. We have before us so many corresponding data, that all doubt as to accidental circumstances must be dismissed. It is thus owing to the low night temperatures that the growth is smallest during the night hours in spite of the fact that the two growth-promoting factors, darkness and high humidity of the air, are at that time exercising their influence. On the other hand, it must be due to the high day temperature that the hop-stem has its greatest rate of growth during the day time. We have here a rule that applies to most of the days of observation, when the course of temperature does not deviate from the usual, but it is also confirmed in the most satisfactory manner by measurements on days with unusual conditions of temperature. Thus, it is seen that the day growth on July 8th, an unusually cold day, was less than the growth during the nights between the 21st and 22nd and between the 22nd and 23rd of July, both of which were unusually warm nights.

All told, the curves show distinctly that the temperature is the dominant factor of the growth rate, being the cause of the daily period in the growth in length of the hop-stem as well as the great variations in the rate of growth from one diurnal period to another.

C. Investigations in 1912.

The investigations in 1912 fall into two series, the first from April 29th to May 16th, the second from June 3rd to June 17th. The measurements were made in exactly the same way as in 1911. The reason for beginning investigations again was, that I wished to ascertain whether the results obtained then would hold good also at lower temperatures than those occurring in July 1911. As will be seen from Pl. II and III, the picture agrees exactly with that obtained in July 1911: quite the same daily course in growth corresponding to the course of temperature and quite similar variations from one diurnal period to another. As in 1911 there is quite naturally some irregularities in the course of the curves, but these are quite unimportant in view of the great correspondence and regularity that is generally present.

It appeared of interest to determine, even though only approximately, the limits of temperature for the growth of hop-stems. From the experiments in July 1911 when a vigorous growth was observed, even at the highest temperatures that could be obtained at that period, namely midsummer, when the glass-house was kept shut, it was evident that with our mode of procedure there was no prospect of being able to determine the maximum temperature. As to the minimum temperature conditions were more favourable. Under natural conditions here in Denmark the parts of the hop-plant stem that are above ground begin their growth in April or still earlier, i. e. at a time of year when the temperatures oscillating about the zero point are common and the young hop-stems may therefore often be exposed to temperatures on both sides of the minimum-temperature for their growth. In order to determine the minimum-temperature, measurements were made on 2 plants in April 1912. Already at a temperature of 6^0—4^0 the growth appeared very slight, only a few mm. (1—3 mm.) in 6 hours and at a temperature between 4^0 and 2^0 in the evening no growth could be

observed in the plants that had grown between 15—20 mm. in 6 hours at a temperature of 12°—13° in the day time.

The experiments should however be repeated on a larger scale and according to a better method, this one being unsatisfactory when we approach the limit of growth. Some of the observations seemed also to indicate that a small growth took place during the night hours and the early morning hours at temperatures a little (1°—2°) lower than those at which the growth had stopped in the evening, and there was apparently also small individual differences in the experimental plants. The error will however hardly exceed 2° if the minimum temperature is fixed at 4°.

This I have done in an endeavour to give a graphic representation of the quantities of heat which are of importance for the growth and which have influenced the experimental plants during the time when regular observations were made.

As seen from fig. 4, the paper on which the thermograph has drawn the temperature curve is divided into small rectangle-like areas made by the vertical and horizontal lines, corresponding to time and temperature respectively. I have assumed, that the size of the area between the 4° line and the temperature curve would give a measure of the quantity of heat important for the growth. For every 6 hours period, therefore, the number of small rectangle-like areas between the horizontal 4° line (minimum temperature) and the temperature curve has been counted, as can readily be seen in the figure.

The numbers obtained, for brevity's sake named «active quantity of heat», are given for every period of 6 hours on the tables showing the growth in the same period. The «active quantities of heat» have also been given on the Plates above or under the growth in mm. of the experimental plants during the same time, and the points thus found have been connected by lines.

A comparison between the graphic representation of the growth and the «active quantities of heat» now shows, that there is a complete correspondence between the course of both. Some small deviations may naturally also be pointed out here, but in comparison with the resemblances they must be called unimportant.

On Pl. III is also given the curve of humidity drawn by a

thermohygrograph. It is seen from this, that the humidity oscillates in a different direction from the temperature, thus reaching

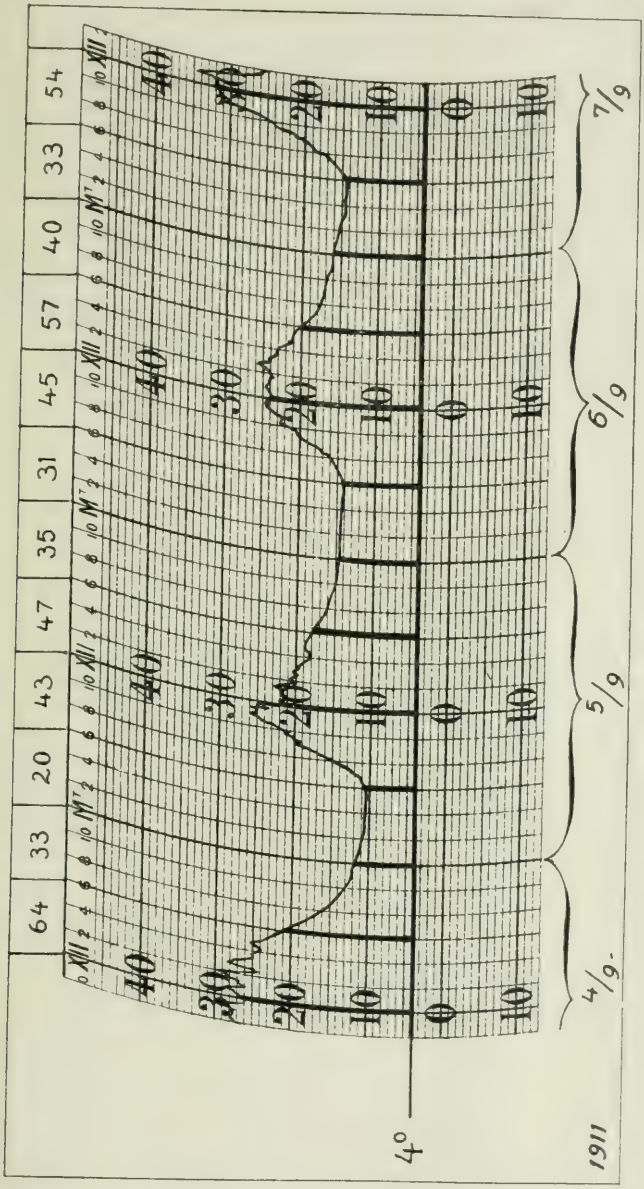


Fig. 4.

its greatest value during the nightly hours when both temperature and growth are low. This condition also confirms the fact,

that the growth-promoting power, which high humidity is known to have under natural conditions, is «covered» by the influence of the temperature so that it appears as if only the temperature was of any importance for the rate of growth of hop-stems.

3. Résumé.

The result of the present investigation may be summed up as follows: It has been found that the growth in length of hop-stems under natural conditions has a very distinct diurnal period, the rate of growth being smallest during the night, greatest during the day. This periodicity is determined by outer factors, among which the temperature has such a predominant influence that under natural conditions it determines the rate of growth

TABLE I.

	July 1911	Growth in mm. Plant No 29	Plant No 83	Plant No 84	Plant No 96	Active quantities of heat	July 1911	Growth in mm. Plant No 29	Plant No 83	Plant No 84	Plant No 96	Active quantities of heat
12—6								24	13	8	12	21
6—12	6						17	26	14	12	20	32
12—6		64	45	48		86		42	26	26	32	42
6—12		41	28	30		51		20	15	14	12	26
12—6		25	16	20		37		22	11	5	14	16
6—12	7	35	23	29		76	18	35	19	14	25	43
12—6		57	33	45	24	82		36	25	18	28	38
6—12		48	35	33	32	64		33	25	18	22	30
12—6		22	13	12	18	33		21	14	10	15	19
6—12	8	33	23	24	23	52	19	38	25	12	25	37
12—6		35	20	25	18	47		47	37	28	35	50
6—12		27	19	17	14	33		35	27	23	21	29
12—6		17	15	7	19	24		23	15	10	16	18
6—12	9	35	26	20	30	72	20	37	24	16	15	37
12—6		60	37	34	43	61		60	38	33	41	54
6—12		34	23	24	28	29		36	27	20	30	30
12—6		16	20	15	19	21		20	11	11	11	15
6—12	10	39	32	25	36	54		39	26	19	28	36
12—6		71	45	58	44	84		64	41	32	37	50
6—12		43	40	38	34	45	21	51	39	31	33	37
12—6		25	21	23	25	34		40	30	26	27	33
6—12	11	35	35	23	32	74	22	47	40	19	27	50
12—6		69	45	58	35	86		75	55	45	37	61
6—12		47	37	38	34	49		65	48	28	33	43
12—6		37	29	24	25	35		52	36	27	25	36
6—12	12	41	38	20	28	75	23	40	30	17	20	50
12—6		70	46	53	35	87		63	47	33	37	65
6—12		56	50	40	42	47					34	38
12—6		40	30	23	33	42					23	31
6—12	13	38	35	17	24	68	24				18	45
12—6		72	47	47	34	67					35	64
6—12		39	30	33	42	41					30	34
12—6		33	28	22	14	34					18	26
6—12	14	45	31	21	28	63	25				25	49
12—6		80	54	59	38	79					30	46
6—12		52	48	29	35	47					24	37
12—6		23	24	16	21	33					23	31
6—12	15	36	28	14	21	58	26				16	46
12—6		54	38	31	27	63					40	64
6—12		38	24	18	24	30					39	43
12—6		17	13	8	15	22					24	38
6—12	16	27	16	14	18	40	27				34	58
12—6		44	27	20	20	34					51	73
6—12		33	21	18	14	24						

TABLE II.

1912	Growth in mm. Plant No 66	Growth in mm. Plant No 17	Active quantities of heat	1912	Growth in mm. Plant No 66	Growth in mm. Plant No 17	Active quantities of heat
April				May			
12–6					7	8	2
6–12 29	30	24	25	8	29	16	23
12–6	34	22	17		49	46	35
6–12	10	9	5		18	17	13
12—6	8	8	0		10	9	4
6—12 30	22	18	15	9	25	30	24
12—6	30	24	20		28	31	20
6—12	11	8	4		21	23	17
May							
12—6	1	5	0		11	17	9
6—12 1	26	27	18	10	24	35	30
12—6	28	30	25		59	49	35
6—12	18	15	14		29	22	16
12—6	5	6	2		12	12	6
6—12 2	22	29	25	11	42	40	35
12—6	37	41	38		51	51	40
6—12	23	19	20		29	23	19
12—6	21	20	12		27	24	15
6—12 3	24	25	21	12	45	54	35
12—6	37	37	35		40	50	33
6—12	19	16	13		20	23	19
12—6	8	6	3		12	12	7
6—12 4	24	22	18	13	39	59	28
12—6	32	29	25		53	62	40
6—12	15	10	6		27	25	14
12—6	4	3	0		10	13	4
6—12 5	21	24	24	14	45	59	31
12—6	22	30	27		55	65	38
6—12	14	15	12		28	23	19
12—6	8	8	2		16	17	3
6—12 6	35	33	30	15	57	69	38
12—6	43	42	33		71	83	47
6—12	20	21	15		35	30	22
12—6	11	12	7		21	20	11
6—12 7	18	17	13	16	45	50	30
12—6	20	21	16		46	51	34
6—12	15	14	10		21	28	15

TABLE III.

	June 1912	Growth in mm.		Active quantities of heat	June 1912	Growth in mm.		Active quantities of heat
		Plant N° 32	Plant N° 36			Plant N° 32	Plant N° 36	
12—6						17	22	31
6—12	3	8	13	30	11	25	38	51
12—6		12	18	29		37	54	55
6—12		13	23	25		26	45	40
12—6		7	9	20		15	27	33
6—12	4	20	22	38	12	29	42	54
12—6		22	33	51		40	55	55
6—12		18	34	31		23	36	35
12—6		3	15	24		12	18	29
6—12	5	12	26	32	13	30	38	46
12—6		13	28	36		33	52	54
6—12		9	24	27		25		36
12—6		8	13	21		18		31
6—12	6	10	15	33	14	12		33
12—6		28	40	58		21		36
6—12		19	38	34		18		28
12—6		8	14	24		12		20
6—12	7	31	46	47	15	16		24
12—6		34	54	64		16		25
6—12		25	46	45		13		20
12—6		16	26	33		16		19
6—12	8	24	33	36	16	33		52
12—6		32	44	49		36		51
6—12		24	39	40		21		35
12—6		12	23	24		8		21
6—12	9	28	29	44	17	26		43
12—6		38	45	50		26		41
6—12		19	33	34				
12—6		15	17	22				
6—12	10	23	30	44	18			
12—6		34	51	57				
6—12		21	34	34				

SUR « L'ERREUR DE SEL » DANS LA MESURE COLORIMÉTRIQUE DE LA CONCENTRATION DES IONS HYDROGÈNE DE L'EAU DE MER

PAR

S. P. L. SØRENSEN ET S. PALITZSCH.

DANS un travail antérieur[1]) nous avons tâché d'approfondir la question relative à l'erreur dite *de sel* provenant, dans la mesure colorimétrique de la concentration en ions hydrogène de l'eau de mer, de la teneur en sel relativement élevée de la solution. Il a été établi que la grandeur de la correction nécessitée par cette erreur dépend, en dehors de la teneur en sel de l'eau considérée, du genre des liqueurs de comparaison employées aussi bien que du réactif indicateur utilisé.

A cette époque-là nous n'avons pu examiner que des eaux de mer contenant, respectivement, environ 35 ‰ et environ 20 ‰ de sel, tandis que des échantillons ayant une teneur en sel moins elevée n'étaient pas à notre disposition. C'est donc avec bien du plaisir que nous nous sommes rendus à une invitation que nous a adressée M. le Professeur et Dr R. Witting, à Helsingfors, d'englober dans nos recherches, afin de compléter les résultats obtenus antérieurement par nous, un certain nombre d'échantillons d'eau pauvres en sel prélevés, par les soins des «Hydrografisk-Biologiska Hafsundersökningarna, Helsingfors», dans la partie septentrionale de la mer Baltique Nous tenons à offrir à M. le Professeur Witting nos bien sincères remerciements pour les échantillons qu'il a bien voulu nous envoyer.

La teneur en sel de ces échantillons en partie très pauvres en sel va d'env. 0,2 ‰ à env. 10,5 ‰, de sorte que, grâce à l'examen auquel nous les avons soumis, nous sommes maintenant

[1]) Comptes-rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg, **9**, 8 (1910).

à même d'établir la correction nécessitée par «l'erreur de sel» dans la mesure colorimétrique de la concentration des ions hydrogène des eaux de mer renfermant une proportion quelconque de sel.

Ainsi qu'on va le voir par la suite, nous avons représenté graphiquement cette dépendance, en portant en abscisses la teneur en sel exprimée en $^0/_{00}$, et en ordonnées la correction de l'erreur de sel, c'est-à-dire la quantité à ajouter à l'exposant des ions hydrogène, p_H^+, trouvé par la mesure colorimétrique, afin de donner l'exposant répondant à la concentration réelle en ions hydrogène de l'échantillon examiné. Ces courbes permettent donc, pour un échantillon quelconque d'eau de mer à proportion de sel connue, de lire directement la correction à introduire dans la valeur de p_H^+ trouvée colorimétriquement.

La correction peut être positive, o ou négative, sa grandeur et son signe dépendant du genre des liqueurs de comparaison ainsi que de l'indicateur, en sorte que chaque courbe ne se rapporte qu'à un indicateur déterminé et à un genre de liqueurs de comparaison déterminé. Cependant, les mesures effectuées jusqu'ici de la concentration en ions hydrogène d'un grand nombre d'échantillons d'eau de mer pris sur les points les plus divers, ont fait constater[1]) que les limites dans lesquelles varie la concentration ionique de l'eau saline sont relativement étroites, de sorte qu'il est possible, au moyen d'une des combinaisons suivantes, de déterminer colorimétriquement la concentration ionique d'une eau de mer quelconque:

a^0 mélanges de borates et phénolphtaléine;
b^0 mélanges de borates et naphtolphtaléine;
c^0 mélanges de phosphates et naphtolphtaléine;
d^0 mélanges de phosphates et rouge neutre.

Les courbes qui indiquent les corrections se rapportant aux trois premières combinaisons, se trouvent reproduites sur les Tables 1, 2 et 3. Pour les mélanges de phosphates et le rouge neutre nous avons autrefois trouvé la correction + 0,10 pour une teneur de $35\ ^0/_{00}$ en sel, et pour $20\ ^0/_{00}$ de sel seulement + 0,05, tandis que les eaux de mer moins riches en sel que nous venons

[1]) Kurt Buch, Föredrag vid Finska kemist-samfundets möte den 9 Nov. 1910. S. Palitzsch, Comptes-rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg, **10**, 89 (1911).

d'examiner ont donné des corrections qui oscillent autour de zéro, étant tantôt positives, tantôt négatives. Etant donné, en outre, que ces dernières déterminations ont causé des difficultés particulières — mentionnées plus loin, p. 257 —, nous n'osons dans le cas présent dresser une courbe pour exprimer les corrections; toutefois, nous croyons pouvoir affirmer que, pour ce qui regarde les eaux de mer à faible teneur en sel (10 ‰ et au-dessous), on peut, sans s'exposer à commettre une erreur appréciable, poser la correction de l'erreur de sel égale à zéro dans la mesure colorimétrique à l'aide du rouge neutre et des mélanges de phosphates.

Partie expérimentale.

Pour déterminer la grandeur de la correction de l'erreur de sel, nous avons procédé de la même manière que dans nos essais antérieurs[1]; nous pouvons donc nous borner à indiquer les traits principaux du mode opératoire.

Un échantillon d'eau de mer à teneur en sel connue a été rendu faiblement, mais nettement, acide par addition d'un peu d'acide chlorhydrique normal au $^1/_5$, après quoi on en a expulsé l'acide carbonique en y faisant passer un courant d'hydrogène du jour au lendemain. Après neutralisation totale ou partielle au moyen de lessive de soude normale au $^1/_5$ exempte d'acide carbonique, puis addition d'une petite portion d'un mélange convenable composé de phosphates ou de borates) destiné à servir de tampon, ce qui a permis de fixer à volonté la concentration ionique et de la maintenir constante durant tout le cours de l'expérience. l'eau ainsi traitée a été mesurée aussi exactement que possible, tant électrométriquement que colorimétriquement. La différence entre la valeur de p_H trouvée par électrométrie et celle obtenue par colorimétrie indique alors la correction cherchée; de même que dans nos essais antérieurs, nous avons cru pouvoir nous dispenser de tenir compte du peu d'influence que le traitement préparatoire peut exercer sur la grandeur de la correction.

Les Tables 1—3 reproduisent les résultats obtenus pour les combinaisons:

mélanges de borates et phénolphtaléine (Table 1)
mélanges de borates et naphtolphtaléine (Table 2)
mélanges de phosphates et naphtolphtaléine (Table 3

[1] Comptes-rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg, **9**, 16 (1910).

TABLE I.

Mélanges de borates et phénolphtaléine.

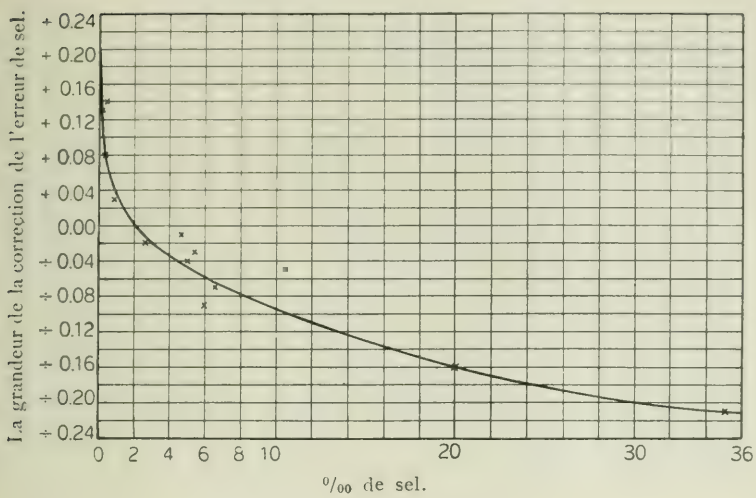


TABLE II.

Mélanges de borates et naphtolphtaléine.

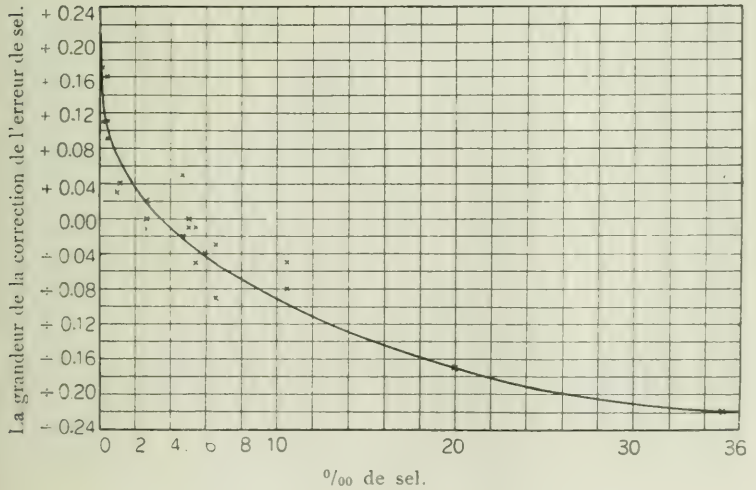
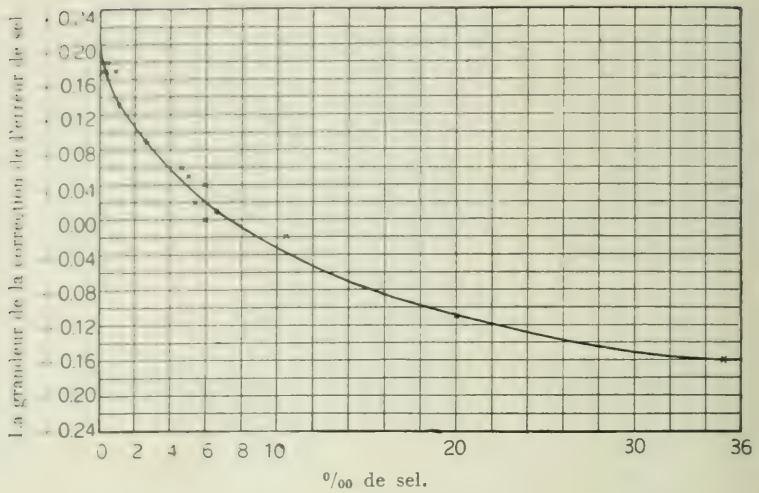


TABLE III.

Mélanges de phosphates et naphtolphtaléine.



la teneur en sel de l'échantillon expérimenté, teneur exprimée en ‰, étant portée en abscisse, et la correction de l'erreur de sel, avec signe, étant employée comme ordonnée. Chaque petite croix dénote un essai. En dressant les courbes, nous avons tenu, autant que possible, un compte égal de tous nos résultats expérimentaux, en même temps que nous avons utilisé les valeurs moyennes trouvées antérieurement pour les corrections correspondant à une teneur en sel de 35 ‰ et de 20 ‰, respectivement.

L'inspection des Tables 1—3 fait voir aussitôt qu'il n'y a point d'accord absolu entre les résultats de nos essais. Aussi on ne pouvait évidemment s'y attendre, étant donné que — comme nous l'avons signalé plusieurs fois[1]) — dans la mesure colorimétrique il faut toujours, même dans les conditions les plus favorables, compter avec une erreur de $\pm$ 0.05 dans la valeur de p_H^+. En examinant de plus près les Tables 1—3, on peut constater qu'une seule détermination (sur la Table des borates et de la naphtolphtaléine) a donné une correction différant de 0,07 de celle que pour la concentration de sel correspondante (4.65 ‰) on peut lire sur la courbe. Pour toutes les autres déterminations, au nombre de 43, l'écart est de 0,05 ou au-dessous, et pour 34 de ces déterminations il n'atteint que 0,03 au plus.

[1]) Ces mêmes Comptes-rendus **8**. 88 (1909), et **9**. 11 (1910).

Ainsi donc, pour les trois courbes dont il s'agit ici, nous avons réussi à obtenir un degré de précision semblable, bien que non égale, à celui qu'ont donné nos essais antérieurs. Il n'en a pas été de même de la combinaison mélanges de phosphates + rouge neutre, auquel cas les corrections trouvées varient d'une façon très irrégulière entre + 0,05 et + 0,07. Selon nous, la raison de ce manque de précision doit être cherchée dans ce fait que les eaux en question présentaient quelquefois une couleur légèrement jaunâtre, fait qui, surtout pour ce qui concerne le rouge neutre, a notablement entravé le mesurage puisque, aux concentrations ioniques dont il est question ici, ce colorant montre précisément des teintes rouge jaunâtre. Nous croyons cependant pouvoir tirer de nos mesures cette conclusion que, dans la mesure colorimétrique des eaux de mer pauvres en sel au moyen du rouge neutre et des mélanges de phosphates, la correction est si minime, qu'on peut sans faire d'erreur sensible la poser égale à zéro.

Depuis la publication de notre communication précédente sur la détermination de l'erreur de sel, K. A. Hasselbalch[1]) a élaboré une méthode electrométrique dite *par agitations*, qui, étant utilisable aussi pour les liquides renfermant de l'acide carbonique, a trouvé une application étendue et qui, surtout pour ce qui concerne les déterminations des ions hydrogène du sang, a déjà rendu de grands services.

Il nous est donc tout naturellement venu à l'idée d'employer cette méthode pour les recherches dont il s'agit ici. Nous avons constaté cependant que l'eau de mer — de même que, en général, les solutions riches en sel et pauvres en tampons — ne pouvait pas être mesurée exactement d'après le procédé primitif de Hasselbalch, parce qu'il ne nous a été pour ainsi dire jamais possible d'arriver à un potentiel constant. Ni M. Hasselbalch, avec qui nous avons collaboré pour la solution de ce problème, ni nous-mêmes n'avons pu parvenir a trouver l'explication des faits en question, faits souvent très capricieux et dont la cause doit probablement être cherchée dans la fort minime teneur en tampons des liquides considérés.

Bien que la raison de ces anomalies reste ainsi toujours

[1] Ces mêmes Comptes-rendus, **10**. 69 1911.

obscure, il est cependant possible, grâce à quelques modifications apportées par M. Hasselbalch dans sa méthode, de faire des mesures exactes même dans des liquides contenant de l'acide carbonique et pauvres en tampons. Les plus importantes de ces modifications, au sujet desquelles M. Hasselbalch va publier une communication detaillée, sont les deux suivantes: D'abord — à l'aide d'un petit électromoteur — on secoue le vase électrolytique continuellement, même pendant le mesurage, et puis l'électrode de platine utilisée est platinée sur toute sa surface et placée dans le vase électrolytique de telle manière que chaque secousse la fait complètement inonder par le liquide.

A l'aide de la méthode Hasselbalch ainsi modifiée, nous avons entrepris une série de mesurages dans les échantillons d'eau de mer mentionnés plus haut (pris dans le golfe de Bothnie) aussi bien que dans des échantillons analogues plus riches en sel. En même temps nous avons déterminé colorimétriquement la concentration ionique. Les valeurs ainsi trouvées pour la correction de l'erreur de sel montrent, en ce qui concerne les eaux à forte teneur en sel, un parfait accord entre elles comme aussi avec nos mesures antérieures. C'est ainsi que, pour la combinaison: mélanges de phosphates – naphtolphtaléine, onze essais avec six eaux différentes contenant environ 35 $^{0}/_{00}$ de sel ont donné, en moyenne, une correction de l'erreur de sel de $\div$ 0,17 (un essai a donné $\div$ 0,24, les autres ont varié entre $\div$ 0,14 et $\div$ 0,20); la correction antérieurement déterminée par nous pour cette combinaison est de $\div$ 0,16. Pour ce qui regarde les échantillons pris dans le golfe de Bothnie, l'accord était moins bon, ce qui vraisemblablement tient à ce que la mesure faite d'après Hasselbalch aussi bien que la mesure colorimétrique correspondante, sont opérées directement dans l'échantillon d'eau de mer pauvre en tampon et dont la concentration ionique est très susceptible de variation. On peut éviter cette source d'erreur en adoptant le procédé employé dans nos expériences principales et dans lequel la concentration ionique est préalablement fixée en ajoutant à l'eau en question une petite dose d'un mélange tampon.

En février 1913.

MÉTHODE POUR DOSER DE PETITES QUANTITÉS DE MERCURE PRÉSENTES DANS LES MATIÈRES ORGANIQUES.

PAR

SVEND LOMHOLT ET J. A. CHRISTIANSEN.

DANS la littérature, on trouve indiquées de nombreuses méthodes pour le dosage des faibles quantités de mercure — allant jusqu'à des fractions de milligramme — qui ont de l'importance pour les recherches concernant la circulation du mercure dans l'organisme. Ces différentes méthodes nous ayant donné généralement des résultats peu satisfaisants, nous avons essayé d'en trouver une nouvelle qui, même pour des mains peu exercées, permît de faire des séries de recherches avec une exactitude suffisante.

Comme les méthodes les plus importantes se trouvent réunies dans le traité de Neuberg «Der Harn», et que des aperçus critiques ont été publiés, entre autres, par P. E. Raaschou[1]) et récemment par H. Buchtala[2]), il nous paraît superflu de passer en revue toutes les méthodes connues. Nous nous bornerons à mentionner brièvement quelques-uns des procédés employés jusqu'ici, afin de faire ressortir les inconvénients que nous avons cherché à éviter.

Les expériences que nous en avons faites nous ont démontré que la méthode de Raaschou (Mesurage sous le microscope du diamètre d'un globule de mercure), si originale et si bonne qu'elle puisse être en elle-même, n'était pas utilisable pour le but que nous nous étions proposé. Premièrement, on a de la peine a

[1]) Zeitschr. anal. Ch., **49**, 172 (1910).

[2]) Zeitschr. physiol. Ch., **83**, 249 (1913). A l'époque où ce mémoire parut, nous avions déjà élaboré notre procédé à nous. Depuis, nous nous sommes assurés, dans la série de recherches mentionnées à la fin de ce mémoire, de son applicabilité pratique.

obtenir que le mercure se forme en globule; deuxièmement, il est nécessaire, pour chaque analyse, de faire un nouveau tube distillatoire en verre, ce qui cause une perte de temps, et, finalement, cet appareil est très exposé à éclater.

Il est certes très facile de faire, d'après Schumacher et Jung[1], par ex., un dosage colorimétrique du mercure à l'état de sulfure de mercure en solution colloïdale; mais les résultats n'en sont pas très sûrs, principalement par suite de l'inconstance de la solution colloïdale.

Pour les analyses à pesées, nous mentionnerons la méthode indiquée par Schumacher et Jung[2], qui plus tard a été souvent employée avec de légères modifications. Ces savants emploient du chlorure stannique pour précipiter le mercure, et, pour le filtrer, un tube à l'intérieur duquel est placé un filtre en amiante doré. Ce procédé, tout en ne nécessitant que des appareils facilement accessibles, offre l'avantage de simplifier les manipulations nécessaires; mais, comme on ne peut que difficilement sécher jusqu'à poids constant un appareil d'une surface aussi grande, il ne donne plus de résultats aussi sûrs lorsqu'il s'agit du dosage de fractions de milligramme.

Il est certainement préférable d'opérer la séparation par électrolyse. Par ce moyen, on arrive à faire précipiter le mercure sur une électrode en or (le mercure s'amalgamant si facilement avec ce métal), dont la tare peut aisément être déterminée avec toute la précision que la balance employée permet d'obtenir. Parmi les savants qui se sont occupés de cette question, O. Schumm[3], et dernièrement encore H. Buchtala[4] en continuation de ses travaux, ont décrit d'une manière détaillée une méthode électrolytique. Tous deux ont opéré l'électrolyse directement dans un liquide simplement obtenu par l'évaporation de la solution formée par la décomposition de la matière organique au moyen d'acide chlorhydrique et de chlorate de potassium. Nous sommes parvenus à éviter les inconvénients qui découlent de cette méthode, à savoir: une concentration de mercure extrêmement faible, de grandes quantités de sels et de matière organique non décomposée, et, conséquemment, des précipités

[1]) Zeitschr. anal. Ch., **41**, 461 (1902).
[2]) *Ibid.*, **39**, 12 (1901).
[3]) *Ibid.*, **44**, 73 (1905).
[4]) *loc. cit.*, p. 1—.

impurs. par une voie détournée, la «précipitation à concentration» [1]), qui rend, il est vrai, notre manière de procéder plus compliquée, mais, en revanche, autant que nous avons pu en juger, augmente la précision des résultats.

Le choix d'un procédé propre à la décomposition de la matière organique en présence de laquelle le mercure se trouve, n'est pas d'une importance moindre que ne l'est la manière d'effectuer le dosage de la quantité de mercure pour obtenir une détermination exacte du genre dont nous parlons.

En opérant suivant un tel procédé, on devra toujours user d'une certaine prudence, les sels de mercure passant pour être volatils à la vapeur d'eau. Toutefois, dans les liquides acides, le danger de perte n'est pas grand; du moins, dans nos essais de contrôle, même à une évaporation assez forte, n'avons-nous jamais pu en constater.

Le procédé de décomposition qui certainement a été le plus employé, est la décomposition à l'aide de l'acide chlorhydrique et du chlorate de potassium (Fresenius et Babo)[2]). Ce procédé peut être utilisé quand il s'agit de liquides renfermant relativement peu de graisse et de matière albumineuse, comme par ex. l'urine; mais on rencontre une certaine difficulté à éliminer entièrement la matière organique, même si l'on emploie des quantités assez grandes de réactifs. Pour le foie ou les reins, par ex., il n'est presque pas possible de l'employer.

Moins utilisé est le procédé de A. Neumann[3]) pour le traitement de la matière organique par l'acide sulfurique et l'acide nitrique concentrés. Il est incontestablement meilleur que celui de Fresenius et Babo; mais il exige aussi de fortes quantités de réactifs et, pour des quantités de liquides tant soit peu considérables, une très longue évaporation. Avec ce procédé aussi existe également la difficulté d'éliminer les derniers restes de la matière organique.

C'est au vu de tous ces inconvénients qu'il nous paraît préférable de se servir de la méthode indiquée par K. T. A. Jensen[4]), qui consiste à faire bouillir avec du permanganate de potassium dans un liquide sulfurique ou nitrique. Cette méthode donne d'ex-

[1]) Raaschou, *loc. cit.*, p. 175.
[2]) Ann. der Ch. und Pharm., **49**, 308 (1844).
[3]) Zeitschr. physiolog. Ch., **37**, 115 (1904).
[4]) Ugeskr. for Læger, **74**, n° 22 (1912).

cellents resultats, non seulement lorsqu'il s'agit de liquides ayant une teneur relativement faible en matière organique, l'urine par ex., mais aussi quand on emploie un traitement préalable à l'acide nitrique fumant, pour des matières telles que les fèces, les organes, etc.

Notre méthode comprend donc les parties suivantes:

I. Décomposition de la matière organique.

II. Précipitation par l'acide sulfhydrique après addition de sulfate de cuivre, puis, filtration («Précipitation à concentration»).

III. Dissolution du précipité de sulfure.

IV. Electrolyse.

V. Pesée.

I. Si, par ex., la matière à examiner est de l'urine, on procedera de la manière suivante: A un litre on ajoutera dans un flacon d'abord env. 80 cc. d'acide sulfurique concentré, et ensuite, du permanganate de potassium en petites portions de 2 gr. env., tout en faisant chauffer jusqu'à ébullition. Après chaque addition, on fait bouillir jusqu'à ce que le liquide commence à se décolorer. Quand la décoloration ne se produit plus, même si l'ébullition dure une heure, l'opération est terminée. L'excès de permanganate est éliminé par l'addition d'une solution saturée d'acide oxalique. Il sera toutefois plus facile, pour les liquides dont on connait la composition, d'ajouter immédiatement l'excès de permanganate que des essais auront fait reconnaitre comme étant convenable, et ensuite de faire bouillir simplement pendant deux heures et demie. 30 gr. de permanganate seront généralement une quantité suffisante pour un litre d'urine. Si, à la fin, l'excès est excessivement faible, si bien qu'il ne faille que très peu de la solution d'acide oxalique pour obtenir la décoloration, on fera mieux d'ajouter encore du permanganate et de faire bouillir à nouveau. Par l'addition d'acide oxalique, le liquide devient limpide et incolore, pourvu que l'oxydation soit terminée.

Si, par contre, on a à traiter des organes, des fèces, etc., on procedera à un traitement préalable, afin de détruire la plus grande masse de la matière organique qu'ils renferment, ce qui a lieu en faisant bouillir en présence d'acide nitrique fumant, de préférence dans un ballon à long col. La graisse pouvant

provoquer une forte écume, il est nécessaire d'observer une certaine prudence lorsqu'on ajoute l'acide nitrique. Au cours de l'oxydation, il se produit un violent développement de vapeurs rutilantes. Quand il y a beaucoup de graisse, il y aura avantage à interrompre l'ébullition lorsque toute la matière solide aura été dissoute, pour refroidir sous le robinet et faire ensuite écouler le liquide de la plaque de graisse formée, ou bien filtrer au travers d'un filtre durci. Dans tous les cas, on réduit par évaporation le volume du liquide obtenu jusqu'à 100 à 200 cc., auxquels on ajoutera de l'eau pour avoir env. 500 cc.; puis ce liquide sera traité par le permanganate de potassium, comme nous l'avons décrit plus haut.

II. L'oxydation terminée, on ajoute $0^{gr},05$ de sulfate de cuivre cristallisé, et le liquide sera neutralisé en partie par l'addition d'eau ammoniacale. Au cas où il contiendrait de l'acide nitrique, il faudrait en outre le refroidir. On y fait ensuite passer de l'acide sulfhydrique jusqu'à ce qu'il en est saturé, et on laisse reposer le ballon bouché, afin de donner au dépôt le temps de se former, après quoi on filtre à la trompe au travers d'un creuset Gooch à rondelle perforée, puis on lave à refus avec de l'eau

Par l'addition de sulfate de cuivre, le sulfure mercurique est précipité sous une forme qui rend la filtration facile.

On devra avoir soin, avant de l'employer, de faire bouillir l'amiante en présence d'acide chlorhydrique, et d'enlever en s'aidant d'un lavage, les plus fines particules qui dans le courant d'un quart d'heure au plus ne seraient pas tombées au fond.

III. Ayant ensuite placé le creuset renfermant le dépôt dans un gobelet en verre de 50 cc., on y ajoute cinq cc. d'acide nitrique concentré (à env. 68 %) et $1^{cc},5$ à un pour cent d'acide chlorhydrique; on couvre le gobelet avec un verre de montre et on fait chauffer jusqu'à un faible commencement d'ébullition, jusqu'à ce que la totalité du métal sulfuré noir soit dissoute[1]).

Après que le tout est dissout, on place le creuset dans un

[1]) Les quantités d'acide indiquées doivent être approximativement observées. Une quantité d'acide chlorhydrique considérablement plus forte rendra la séparation électrolytique du mercure et du cuivre plus difficile, tandis qu'une quantité considérablement plus faible aura pour résultat une dissolution incomplète du sulfure de mercure. Des quantités plus grandes d'acide nitrique pourront en partie empêcher la précipitation électrolytique du mercure.

entonnoir, puis on lave le filtre soigneusement, de façon à ce que l'eau de lavage et le liquide filtré arrivent à former ensemble un volume d'environ 40 cc.

On procède ensuite à la précipitation par électrolyse du mercure du liquide bleu et clair. Comme anode, on se sert d'un fil de platine, et comme cathode, d'une mince plaque d'or (1 × 2 cm.) à laquelle est soudé un fil de platine. On pourvoit à une agitation suffisante du liquide en y insufflant de l'air au moyen d'une trompe soufflante. Avec une tension de 1,5 volts et une circulation active du liquide, tout le mercure pour ainsi dire sera précipité au bout de 6 à 8 heures, l'erreur se montant tout au plus à 0,1 mg., alors que, à cette tension[1]), le cuivre n'est pas du tout séparé, ou il l'est en très faible quantité s'il est en présence d'un peu d'acide chlorhydrique. Pour plus de sûreté, nous avons toujours électrolysé pendant une durée de 18 à 20 heures. Après ce laps de temps, on élimine le liquide par un rinçage à l'eau distillée sans interrompre le courant, puis on dévisse la vis du pôle[2]) et on met sécher la cathode dans un exsiccateur. On ne peut conseiller de la sécher à l'alcool et l'éther, car il peut facilement arriver, surtout pour d'assez fortes quantités de mercure, qu'il se détache un peu de métal de l'électrode.

V. L'électrode étant sèche, on la pèse, on la fait rougir dans un tube en verre, dans lequel on fait passer un courant d'hydrogène, pour éviter l'oxydation d'une trace possible de cuivre précipité. Finalement, on fait refroidir l'électrode et on la pèse à nouveau.

Ainsi que le démontrent les quelques essais de contrôle que nous exposons ci-dessous, notre méthode donne des résultats particulièrement sûrs. Elle est bien un peu compliquée, il est vrai; mais cependant, lorsqu'il s'agit d'une série d'analyses, il ne faut pas plus d'une à deux heures de travail pour chaque analyse pour peu qu'on se soit rendu familière la technique, qui en est bien simple. Elle ne demande aucun appareil compliqué.

Pour ce qui concerne la prise de courant, nous remarquerons que le courant d'une conduite ou celui d'un accumulateur sont de beaucoup préférables. Les piles sèches peuvent être utilisées,

[1]) Freudenberg, Zeitschr. physik. Ch., **12**, 97 (1893).
[2]) Schumm, *loc. cit.*, p. 83, la note.

elles donnent même la force voulue, mais elles doivent être renouvelées assez souvent[1]). Les piles de Cupron se sont montrées inutilisables, vu qu'elles étaient inconstantes et incommodes. Pour obtenir la tension nécessaire de 1,5 volts et pouvoir en même temps la varier un peu, on pourra, comme nous l'avons fait nous-mêmes, procéder à un dédoublement du courant d'après le principe de compensation de Poggendorf.

Pour nos expériences, nous nous sommes servis de la balance analytique ordinaire de Sartorius à Gœttingue, dont l'aiguille marquait 4 traits par milligramme.

D'après cette méthode, nous avons procédé à plusieurs séries de recherches sur l'élimination du mercure dans les fèces et l'urine de malades atteints de syphilis et traités au mercure, et les résultats en ont été excellents. De même dans quelques recherches sur les quantités de mercure qui se trouvent dans le corps après des empoisonnements mortels occasionnés par le mercure, ou des décès survenus à la suite d'un autre mal au cours d'un traitement au mercure, cette méthode a donné des résultats parfaits, même dans les cas où, comme dans les analyses de foies, de poumons, de canaux intestinaux et de cervelles, il s'agissait de quantités très importantes de matières organiques. Nous donnerons ailleurs une description détaillée des résultats obtenus. Pour le moment, nous nous bornerons à citer une partie de nos essais de contrôle.

1° Dans 500 cc. d'urine, on ajouta $2^{mgr},8$ d'Hg. (sous forme de solution de $HgCl_2$), 40 cc. H_2SO_4 conc. et 15 gr. de $KMnO_4$, puis on fit bouillir pendant 3 heures, pour ensuite procéder aux diverses opérations décrites précédemment: précipitation, filtration, dissolution et électrolyse.

Electrode + Hg	$0^{gr},1360$
Electrode à vide . . .	$0^{gr},1332_5$
Différence (Hg)	$2^{mgr},7_5$

2° Dans 500 cc. d'urine, on mit $2^{mgr},4$ Hg, puis on procéda aux manipulations énumérées ci-dessus.

Electrode + Hg	$0^{gr},5181_5$
Electrode à vide . . .	$0^{gr},5158$
Différence (Hg)	$2^{mgr},3_5$

[1]) La force du courant devant être d'un milliamp. environ pour les électrodes ayant les dimensions indiquées, on pourra calculer la durée des piles, quand on en connaît la capacité.

3° On ajouta à 500 cc. d'urine $1^{mgr},2$ Hg.

Electrode + Hg	$0^{gr},4520$
Electrode à vide . . .	$0^{gr},4508$
Différence (Hg)	$1^{mgr},2$

4° $0^{mgr},48$ Hg dans 500 cc. d'urine.

Electrode + Hg	$0^{gr},525\,1_5$
Electrode à vide . . .	$0^{gr},5247$
Différence (Hg)	$0^{mgr},4_5$

5° A 50 gr. de fèces on ajouta d'abord $2^{mgr},8$ Hg, puis $0^{gr},05$ de sulfate de cuivre et 300 cc. d'acide nitrique fumant. Après une heure d'ébullition, on passa le tout au travers d'un filtre durci, et on fit un lavage à l'acide nitrique concentré (à 68 %). Le filtratum fut ensuite bouilli pendant encore une heure et demie et étendu d'eau distillée jusqu'à un volume de 500 cc., après quoi on ajouta $KMnO_4$ en trois portions de 5 gr chacune, chaque fois que le liquide se décolorait, le tenant toujours en ébullition pendant en tout deux heures et demie. Puis on procéda à la précipitation du liquide obtenu, à la filtration, *etc.* (voir ci-dessus).

Electrode + Hg	$0^{gr},1361$
Electrode à vide . . .	$0^{gr},1334$
Différence (Hg)	$2^{mgr},7$

6° 50 gr. de fèces, auxquelles on avait ajouté $1^{mgr},2$ Hg, furent traités de la manière décrite ci-dessus.

Electrode + Hg	$0^{gr},5441$
Electrode à vide . . .	$0^{gr},5429$
Différence (Hg)	$1^{mgr},2$

Pour tous ces essais, l'électrolyse dura environ 18 heures à un courant de 1,5 volts. La force du courant était au commencement un peu plus d'un milliamp., mais à la fin, elle était tombée aux environs de 0,1 milliamp

Les premiers essais ont été faits au Laboratoire de Carlsberg, les autres, au Laboratoire de chimie de l'Hôpital municipal à Copenhague. Nous exprimons encore ici notre vive gratitude à M. le professeur S. P. L. Sørensen et à M. V. Scheel, docteur en médecine et chef de l'Institut d'anatomie pathologique de l'Hôpital municipal de Copenhague, pour l'intérêt qu'ils nous ont témoigné, et, pour terminer, nous remercions également M. le professeur E. Ehlers pour l'extrême obligeance avec laquelle il nous a fourni les matériaux nécessaires.

Juin 1913.

JOHS. SCHMIDT:

INVESTIGATIONS ON HOPS

(*Humulus lupulus*, L.).

II. THE ROTATIONAL MOVEMENT OF HOP-STEMS AND ITS DIURNAL PERIODICITY.

With 3 text-figures, 7 tables and 1 Plate.

BY

JOHS. SCHMIDT.

1. Introduction.

When the hop seed germinates, the cotyledonous stem grows in the beginning vertically upwards and this is also the case with the shoots of older hop plants. After the stem has reached a certain height above the ground, in seedlings often only 10 cm., in strong shoots of older plants much more, it ceases to grow vertical. The upper end of the shoot now bends horizontally and then begins a circular or rotatory movement in the direction of the clock round the older, vertical part of the stem.

That this form of movement in the twining plants is determined by the force of gravity, is well-known through the experiments of Sachs, Noll, Baranetzky and others. The facts observed are expressed by saying, that the stem in the beginning is negative geotropic, later lateral geotropic, but these definitions do not indicate any close comprehension of the true nature of the phenomenon. On the other hand, it is very easy to see what advantages the movements mentioned give to a twining plant such as the hops. By first growing vertically upwards the stem gets free of the soil and the lowest plants around and by its later rotational movement it has the chance of coming into contact with a support, twining round which it can then continue its growth. If it does not meet any support immediately after it has begun its rotating, this is continued, the apex owing to the growth in length of the horizontal part of the stem describing circles of constantly increasing radii. It

follows from this, that the "seeking" hops stem obtains a greater and greater "range", which naturally greatly increases its chance of meeting such a support, without which the plant is unable to unfold its growth in a normal manner.

In the following I shall describe some observations and experiments on the rotational movement of the hops stem which have been made by the Physiological Department of the Carlsberg Laboratory. They are directly connected with the observations published earlier[1] on the growth in length of the hops stem, in so far as both start from the basis of studying the movement in relation to the outer factors, on which their intensity depends.

The measurements have been made by myself with the assistance of Mag. sc. O. Winge, who has also taken part in summarising the material. Further, I have received help in carrying out the measurements from the Laboratory attendant N. R. Poulsen and the Laboratory gardener Chr. Smith.

2. Method of observations.

On walking about among hops, it is difficult to avoid seeing the rotating movements made by the horizontal ends of the shoots and one is often astonished both at the wide area over which they can stretch and the rate or rapidity of the rotation. On observing once, that a shoot turned round not less than ca. 60^0 in a quarter of an hour, it occurred to me that it would be of interest to follow this movement and discover, whether it showed a similar dependency on the external factors as the growth in length of the stem. Such observations were then made during May and June 1913.

The object was to measure the movement in a convenient and simple manner, so that the observations could be carried out on a large scale with the means available. This was done in the following way. A circular piece of cardboard was divided into degrees and in its centre was fixed an easily movable pointer, also of cardboard. The circular disc was placed under the horizontal end of the shoot, whose rate of rotation was to be measured, and the pointer placed parallel with the end of the stem

[1]) Comptes-rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg **10**, 234 (1913).

and at 0°. After half an hour another observation was made. The end of the stem had now changed its position, forming an angle with the pointer on the disc. The change in position was determined by rotating the pointer until it was again parallel with the end of the stem, the number of degrees rotated being then noted. In this way the preliminary observations were continued for 20 hours on two plants, until it appeared clear, that the method in spite of its simplicity was of use for the object in view.

With reference to the accuracy of the method it may be said, that the sources of error are quite unimportant, considering the use made of the material. In the measurements made in the experimental garden the error of the readings may perhaps in unfavourable cases amount to 10°, in general however scarcely more than 5°, and still less in the readings made in the laboratory. Further, since the errors are not added together, when it is a case, as here, of taking the total angle rotated through over a period of several hours, they have no importance whatsoever by comparison with the great changes actually observed. A greater risk of error lies in the fact, that the rotation itself does not proceed at the same rate even under uniform external conditions, especially when the older part of the stem, round which the point rotates, is not quite vertical. But this is not of essential importance either, when, as here, we take account of such long periods of time, that several turns are made within these. By taking care, further, that the older part of the stem remains as far as possible vertical, there is naturally a greater chance of obtaining a uniform rotation.

3. On what does the rate of rotation depend?

It appeared already from the preliminary experiment of 20 hours, that the rate of rotation must depend on outer factors, as the 2 different plants showed precisely the same changes, both in course and amount. Thus, on representing these changes graphically two parallel curves were obtained, which were precisely similar to those obtained from the preliminary experiments made in June 1911 on the growth in length (l. c. fig. 1). I then proceeded to the main experiments, which are to be described in the sequel. They fall into 3 groups, the most important of

which were carried out in the experimental garden of the Laboratory with older, deeply rooted plants. The others were made in the rooms of the Laboratory and in a cellar with low, constant temperature; in these cases young plants in pots were used (partly seedlings, partly cuttings). All the experiments were made in May—July 1913.

A. Investigations under natural conditions.

Here two very strong plants were experimented on, which were in their 3rd year and deeply rooted in a glass-house (cold house) in the garden of the Laboratory. The observations were begun on May 28th 1913 and continued till June 14th with a break of 3 days (7—10 June). The rotation was studied on 5 shoots, 4 belonging to the same plant (N° 14, from Germany), the 5th an English plant (N° 36). The two plants were in separate compartments of the glass house and this was kept open during the experiment.

During the weeks of the experiment observations were taken continuously every hour. When it was found, that the rotation proceeded slowly in the morning, however, no measurements were made as a rule in the period between 2 a. m. and 6 a. m. On the other hand, under conditions where the rate of rotation was specially great measurements were taken every half hour. In this way the plants were kept under control during the whole time of the experiment, so that every turn was registered. Altogether 1336 observations were taken. The total result is seen in the accompanying Table I. This shows for each plant and shoot the total rotation in degrees and the total number of turns,

TABLE I.

Rotation under natural conditions. Experiments with older plants.

	N° of whole days under observation	Total rotation in degrees	N° of turns	N° of turns per 24 hours (Average)	N° of degrees per hour (Average)
Plant N° 14:					
Shoot a.	9	24865°	69	7.7	115°
b.	9	25875°	72	8.0	120°
c.	11	29810°	83	7.5	113°
Plant N° 36.	13	37600°	104	8.0	120°

also the averages per 24 hours and per hour. Further details are given in Table II.

It appears from the Table, that there is some individual variation between the plants and shoots in regard to the rate of rotation. The average rate of rotation however approximates to 8 turns per 24 hours or 120^0 per hour. Expressed in another way this means, that the rotation proceeded at an average rate equal to one-third of the rate of the minute hand of the clock.

It is not sufficient, however, to have determined the average rate of rotation, we must examine more closely into its daily variation and dependency on external factors. For this purpose, as in the previous experiments (l. c.) on the rate of growth, I have divided the day into 4 periods of 6 hours between the times 12 midnight, 6 a. m., 12 noon and 6 p. n. For each of these 6 hours' periods I have then added together the single observations of the amount of rotation. The result is shown graphically on the accompanying Plate IV. In this the date and time of day are given along the horizontal axis and the sum of the rotations (in degrees) per 6 hours for each of the 5 shoots investigated along the vertical axis.

The Plate shows at the first glance, that the rotational movement by no means proceeds at a uniform rate; it varies both from day to day and in the course of a diurnal period. Further, it is seen from the Plate, that there is a very complete agreement between the 5 shoots; when the rate of rotation decreases or increases in the one shoot, the same occurs simultaneously in the others. From this it follows, that the cause of the variations must lie in the influence of the outer factors and not in the inherent qualities of the plant. Looking closer into the variations, we find, that the rate of rotation is practically always greatest in the period from 12 noon till 6 p. m. and least in the period from 12 midnight till 6 a. m. In the two intervening periods the rate lies between these two extreme points, but is as a rule greater between 6 a. m. and 12 noon than between 6 p. m. and 12 midnight.

The result is, therefore, that the rate of rotation has a distinct diurnal periodicity.

Having thus ascertained, that the rate of rotation is determined by the outer factors, it became desirable to obtain further

TABLE II.

	May 1913	Rate of rotation				Active quantities of heat
		Plant No 14 a	Plant No 14 b	Plant No 14 c	Plant No 36	
12—6	28					
6—12		1135				54
12—6		515	555			33
6—12						
12—6	29	330	405		410	18
6—12		455	515		475	28
12—6		460	505		490	26
6—12		510	525		560	27
12—6	30	435	525		465	26
6—12		500	605		700	32
12—6		560	565	780	715	32
6—12		500	525	570	570	29
12—6	31	455	480	470	475	25
6—12		1010	945	1120	750	45
12—6		1455	1255	1560	1380	75
6—12		795	860	880	845	50
12—6	June 1	495	670	600	715	34
6—12		805	810	855	855	44
12—6		1165	1200	1205	1445	58
6—12		575	660	630	815	34

	June 1913	Rate of rotation				Active quantities of heat
		Plant No 14 a	Plant No 14 b	Plant No 14 c	Plant No 36	
12—6	2	480	490	510	535	29
6—12		710	695	630	870	39
12—6		820	940	1065	960	52
6—12		645	720	715	820	39
12—6	3	545	585	500	650	28
6—12		800	750	830	795	43
12—6		1200	1040	1100	1240	58
6—12		705	695	610	660	40
12—6	4	465	555	430	495	25
6—12		765	755	755	820	47
12—6		1095	1025	1380	1310	66
6—12		515	630	625	725	35
12—6	5	335	465	355	500	22
6—12		710	715	840	1125	51
12—6		1020	1105	1200	1600	67
6—12		585	650	670	950	42
12—6	6	525	540	600	730	35
6—12		740	570	630	920	45
12—6		1150	1200	1280	1410	67
6 12		550	700	705	915	43
12—6	7		550	500	610	31

	June 1913	Rate of rotation			Active quantities of heat
		Plant No 14 c	Plant No 14 d	Plant No 36	
12—6	10				
6—12					29
12—6			325	340	29
6—12		375	195	210	20
12—6	11	285	100	165	18
6—12		445	290	275	28
12—6		480	310	300	33
6—12		400	210	135	22
12—6	12	250	200	125	12
6—12		455	420	445	31
12—6		925	1040	1135	64
6—12		395	460	575	29
12—6	13	275	250	250	13
6—12		390	420	640	31
12—6		485	550	800	43
6—12		400	340	420	24
12—6	14	125	80	160	10
6—12		520	640	720	34
12—6		660	730	1120	60
6 12		570	460	640	65

light on these. Considering the results I had arrived at in the frequently mentioned investigation on the rate of growth in hop stems, it seemed reasonable to conclude, that the temperature was the most important factor. This was investigated by means of a thermograph placed between the shoots of Plant N 14, which was under observation. For this reason the Plate also shows the temperature curve drawn by the thermograph in the course of the experiment. A comparison of the curves for the rate of rotation with the temperature curve shows at once such a clear agreement between the two, that it must clearly be the temperature in the main, on which the rate of rotation depends. This is well seen on days with normal temperature conditions, e. g. the days between June 1st and 5th, where high day temperatures alternate with low night temperatures. Here the rate of rotation mounts abruptly to its maximum in the day hours and sinks just as abruptly to the minimum in the night hours. The condition on days with variable temperatures is not less finely seen, e. g. on May 28th and 29th and in the night between June 5th and 6th. The former were unusually cold days and in agreement with this the rotation proceeded comparatively very slowly. On the other hand, the night between the 5th and 6th of June was unusually warm, which has resulted in a rate of rotation unusually high for the period between 12 night and 6 a. m. Something similar can also be noted for the night between May 31st and June 1st. Both these nights show rates of rotation, which are just as great as or greater than the rotations in the day hours on the cold days mentioned. All this can be seen clearly from a close comparison of the curves on the Plate II, and such a comparison leaves no doubt, that under natural conditions it is in the main the temperature, which is determinative for the variation of the rate of rotation both during a diurnal period and from one day to another.

In the accompanying fig. 1 the fluctuations in the degree of humidity during the period May 28 to June 4 are shown graphically. This figure, which also shows the fluctuations in the rate of rotation for the same period for plant 14, shoot b, shows apparently a reduced rate of rotation accompaying an increased humidity, but the explanation is simply, that under normal conditions a rising temperature means declining humidity. The connection between degree of humidity and rate of rotation is

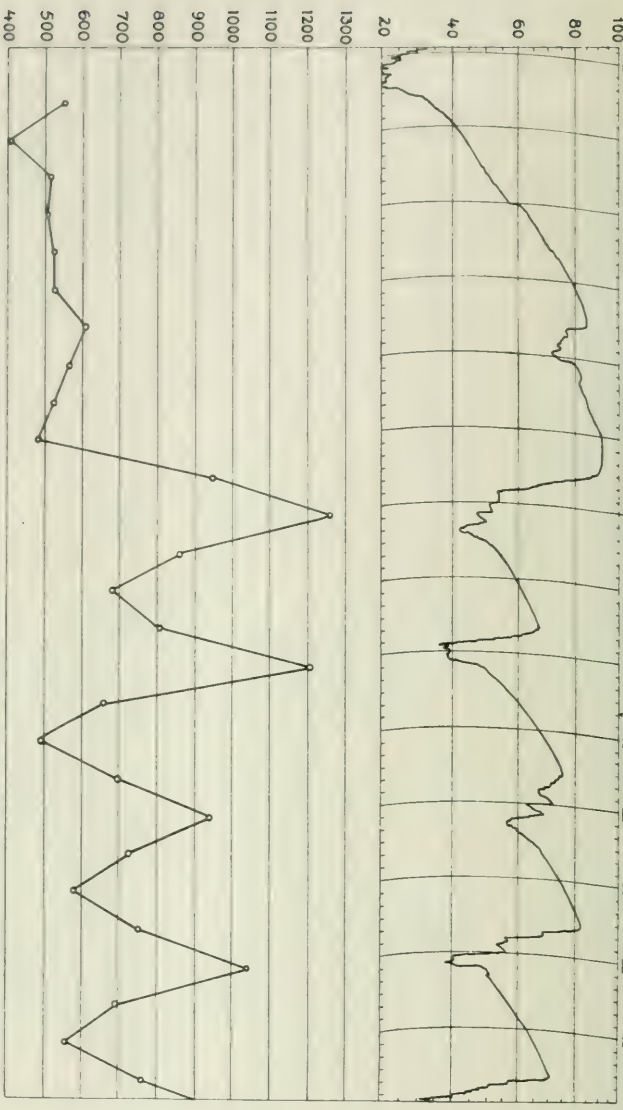


Fig. 1. Curves of humidity and rotation, showing an apparent connection between humidity and rotation.

Fluctuations in the rate of rotation.

Fluctuations in the degree of humidity.

thus only apparent. On the other hand, it can be seen from the experiments mentioned on p. 278 and summarised in Tab. VII, that increased humidity of the air tends to hasten the rate of rotation.

It thus appears, that the rotational movement, as is natural, comes under quite the same laws as the rate of growth, since both are determined by the temperature. To emphasize this, the accompanying Plate IV has been drawn up on the same scale and in the same manner as the Plates in the paper cited on the rate of growth. A comparison shows at once, that the curves for the two functions have quite the same form. There is this difference, however, that the rotation curves show small irregularities to a much less extent than the growth curves. This probably arises from the fact, in great part, that the measurements of the rate of rotation, owing to the much greater changes, have been made with distinctly greater accuracy than those of the rate of growth.

B. Investigations under artificial conditions.

In the previously described investigations on the rate of growth I was obliged to restrict my work to older, deeply rooted plants, as it was only these that indicated sufficiently great changes to be registered with sufficient accuracy by the method employed. The case was different with the rotational movement; here even quite small seedlings displayed such great changes, that these could easily be measured, and the opportunity was thus presented of carrying out experiments in the Laboratory, by which the minimum temperature for the rotation could be determined. As the only room available with such low temperatures as were necessary for the experiment, was a dark room, I was obliged first of all to determine more closely, whether the difference between light and darkness had any essential influence on the rate of rotation.

These experiments were carried out with 2 seedlings about 25—30 cm. high in the period between June 12th 11 a. m. and June 14th 1 a. m. with a break of 7 hours, thus altogether 31 hours. The plants, which were growing in pots, were during the experiment placed on a table by a window facing west in the Laboratory and only received scattered daylight.

The experiment was made in such a way, that one of the plants was covered by a black cardboard cylinder, which quite shut out the light whilst the second plant stood uncovered close by its side. The observations were taken at intervals of an hour. Every second or third hour the cardboard cylinder was shifted

from the one plant to the other, so that each stood alternately 2 hours in the light and 2 hours in the dark. During the experiment the temperature varied between 15.6° and 18.8°. As a rule the temperature inside the cylinder was a trifle lower than outside, most often however less than 1°. The greatest temperature difference was 2°, but most of the observations showed less differences than ½°.

The result of the measurements are seen in the Table III.

TABLE III.

Rotation in light and dark alternately. Experiment with seedlings. 12—14 June.

	Plant A	Plant B
Total rotation, 31 hours	3530°	3580°
Average rotation per hour	114°	115°
Rotation in the dark, 19 and 21 hours . . .	2335°	2365°
Average rotation in dark, per hour	**123°**	**113°**
Rotation in the light, 12 and 10 hours . . .	1195°	1215°
Average rotation in light, per hour	**100°**	**122°**

The experiment shows, that there was no essential difference in the rate of rotation in scattered daylight and in the dark, for the one plant rotated a little more quickly in the light, the other in the dark. In other experiments the plants were placed alternately in the dark and light for periods of up to 4 hours, but even these experiments of longer periods showed no difference in the rates of rotation, and it was clear therefore, that the experiment on the minimum temperature for the rotation could well be carried out in a dark room like that at my disposal. In this room, a cellar in the Carlsberg Brewery, the temperature was constantly 3.4° and the humidity of the air high.

The experiments in the cellar were carried out by Mag. sc. Ø. Winge from the 17th to the 19th of June 1913. Partly seedlings, partly cuttings were used, in both cases pot plants.

The result of the first experiment on June 17th with 3 seedlings ca. 30 cm. high, the first of which (N° 1) was the same as plant A in the previous experiment on the influence of the dark on the rate of rotation (see Table III above), was as follows:

TABLE IV.

Rotation at a temperature of 3.4°. Experiment with seedlings. June 17th.

Rotation	Plant 1	Plant 2	Plant 3
11 a. m.—12 noon	20°	42°	10°
12—1 p. m.	5°	12°	1°
1—2 p. m.	7°	11°	1°
2—3 p. m.	4°	4°	17°
3—4 p. m.	7°	2°	4°
4—5 p. m.	5°	2°	6°
12—5 p. m.	28°	31°	29°
Average per hour (12—5 p. m.)	**5.6°**	**6.2°**	**5.8°**

We thus see, that the plants during the first hour after being brought into the low temperature showed a not inconsiderable rotation, but that the rate in the 5 hours thereafter sank to a very low value, to only ca. 6° per hour on an average for the three plants. For comparison it may be recalled, that the average rate per hour in the experiments mentioned earlier under higher temperatures amounted to between 100° and 120°.

The second experiment was carried out on June 18—19 with cuttings ca. 30 cm. high. The result is seen from the accompanying Table V.

TABLE V.

Rotation at a temperature of 3.4°. Experiment with cuttings. June 18 - 19.

Rotation	Plant I	Plant II	Plant III	Plant IV
June 18. 12 noon—1.20 p. m. . .	25°	23°	11°	0°
1.20—3.20 p. m.	20°	7°	9°	0°
June 19. 9.50 a. m.—1.50 p. m. .	0°	4°	10°	0°
June 19-20. 1.50 p. m.—9.50 a. m.	0°	18°		0°
per hour (June 19-20)	**0°**	**1°**	**2.5°**	**0°**

As in the previous experiment (Table IV) the rotation in the first hour or hours was not wholly negligible, but thereafter it became extremely slow or in several cases it quite ceased. That the low temperature has not materially affected the rotating power of the plant, however, is seen from the following control experiment with Plant III, which was taken from the cellar to the Laboratory, where it was kept under observation for 4½ hours on June 19.

TABLE VI.

Rotation at a temperature of 20°—21°. Control experiment with Plant III. June 19.

		Air temperature	Ground temperature
2 p. m.—3.30 p. m. . . .	75°	20.0—20.9°	4.0—13.7°
3.30 p. m.—5 p. m. . . .	150°	20.9—20.2°	13.7—15.1°
5 p. m.—6.30 p. m. . . .	230°	20.0—20.4°	15.1—16.0°
2 p. m.—6.30 p. m. . . .	455°	20.0—20.9°	4.0—16.0°
Average per hour	101°		

The result of these experiments at 3.4° is, therefore, that some plants still show an extremely weak rotational movement at that temperature, whilst in others it is completely stopped. We may conclude, that this temperature is very near the minimum temperature for the rotational movement in the hop plant, which is in good agreement with the minimum temperature for the growth, which was found earlier (l. c.), namely about 4°.

In the cellar, where the experiment at low temperature was carried out, the air was saturated with moisture. It therefore was desirable to investigate the importance of the degree of humidity for the rate of rotation by direct experiment, which would also be a test of the apparent agreement shown in fig. 1, p. 274.

The experiment was carried out from Juli 26—28, 1913, in the Laboratory with two seedlings ca. cm. high in pots. Over the one was placed a belljar containing a plentiful supply of wet filter-paper, whilst the other plant stood directly at the side of the bell-jar. Inside the latter the air was saturated with moisture, outside the degree of humidity varied between 40° and 50°. The bell-jar was moved from the one to the other every 3rd hour. Observations were taken every hour, in all 21 hours, and the rotation, air and soil temperatures were noted each time (see Table VII, p. 279).

For Plant I the average air-temperature was 21° both inside and outside the bell-jar, for Plant II respectively 20.7° and 21.4°, whilst the average temperature of the soil for Plant I inside the bell-jar was 20°, outside 18.5°, and for Plant II respectively 20.3° and 18.5°.

We are able to conclude from the experiment, that an in-

TABLE VII.

Rotation under alternately high and low humidity. Experiment with seedlings, July 26—28.

	Plant I	Plant II
Total rotation, 21 hours	1675°	1500°
Average rotation per hour	80°	72°
Rotation under 100% humidity		
Rotation for 12 hours (Plant I), 9 hours (Plant II)	1090°	925°
Average rotation per hour	91°	103°
Rotation under 40—50% humidity		
Rotation for 9 hours (Plant I), 12 hours (Plant II)	585°	575°
Average rotation per hour	65°	48°

crease in the humidity of the air has no retarding influence on the rate of rotation. It follows from this again, that we are entitled to conclude from the experiments in the cellar, that it was the low temperature and not the high degree of humidity, which retarded or stopped the rotation. Further, the experiment shows, that it is excluded, that the diurnal period in the rate of rotation under natural conditions is due to fluctuations in the degree of humidity, as might seem to be the case from fig. 1, p. 274.

C. Correlation between the rate of rotation and the active quantities of heat.

According to the experiments on the rate of growth and rate of rotation the minimum temperature for both must be placed at ca. 4° or perhaps a trifle lower[1]).

As in my previous work on the rate of growth (l. c. p. 246) I have here used the minimum temperature as starting point for the graphic representation of the quantities of heat, which have been of importance for the rate of rotation during the main experiment in the garden.

The accompanying figure shows a piece of the strip of paper on which the thermograph has drawn a curve. This is divided into small, rectangle-like areas produced by the lines of temperature and time cutting each other. On adding up for each

[1]) It may be remarked here, that on comparing the thermograph with correct thermometers, it was found to be adjusted a little over ½° too high. Thus, 4° on the thermograph curves corresponds to a temperature of a little below 3½°.

6 hours' period the number of areas lying between the horizontal line of 4° and the temperature curve we obtain presumably a relative measure of the quantities of heat, which have been operative on the rate of rotation, and which I therefore call "active quantities of heat".

In the detailed Table II dealing with the main experiments the active quantities of heat are indicated for each 6 hours' period. Further, they are represented graphically on the Plate along with the temperature and rotation curves, the values being placed vertically above or below the values for the rotation of the plants within the same period, and the points thus obtained are connected by lines.

A comparison of the curves for the rate of rotation and active quantities of heat shows complete agreement between them. The course in both is the same and to such an extent, that the curve for the quantities of heat might quite well serve for the curves for the rate of rotation and conversely, and even in details we can notice only few and small differences (cf. however below). Further, consideration of the Plate shows, that the fluctuations in the quantity of heat and rate of rotation synchronise, so that there can be no question of the variation in the quantity of heat only displaying itself in the rate of rotation as an after-effect.

When we measure the rate of rotation of the same shoot for a long period without allowing it to twine, we notice, that it decreases somewhat as the shoot increases in length and thickness. This appears from Pl. IV on comparing the two periods May 28—June 7 and June 10—June 14. We see from this, that the rate of rotation in relation to the temperature (quantities of heat) is not so great in the latter period, as we might expect from the results obtained in the beginning of the experiment.

D. Comparative experiments with other twining plants.

In connection with the above experiments, some investigations on the rotation of twining bean plants, which were carried out in the first half of July 1913, may be mentioned. As is known, the bean twines to the left, the hops to the right; otherwise the mechanism appears to be the same.

The rate of rotation was measured in the same way as for the hops and here also the temperature was registered by a

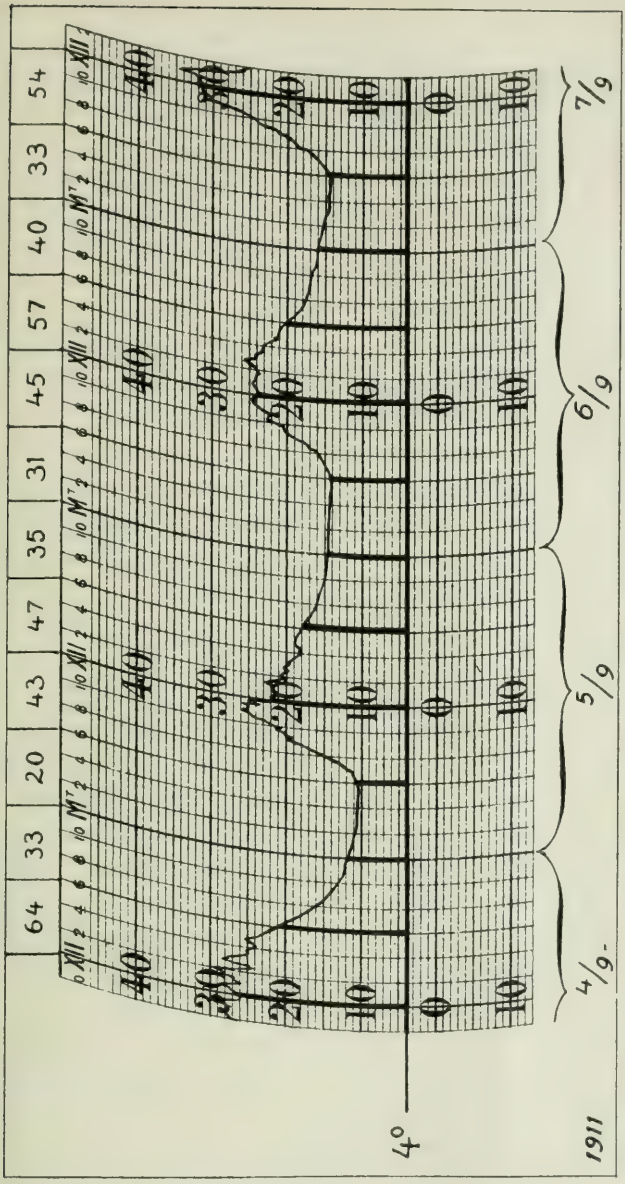


Fig. 2. To illustrate the manner in which the "active quantities of heat" determining the rate of rotation are calculated. See also text p. 279—280.

thermograph. The experimental plants (I, II, III) were rooted in free soil in the open air under direct sunlight until about 3.30 p. m. I had no opportunity of determining the minimum temperature for the rotational movement of the bean plant. In cal-

culating the "active quantities of heat" I assume, that the minimum as for the hops is 4^0, which is hardly far wrong.

The measurements were made without interruption from the 8th to the 17th of July. The result is shown graphically in fig. 3 in the same manner as in the hop experiments, and requires no further explanation. There is a perfect agreement with the hops; the rate of rotation has a marked diurnal periodicity, which closely follows that of the temperature and the same was found in *Lonicera Periclymenum*, L.

There can be little doubt, therefore, that the rate of rotation of the twining plants has a more or less distinct diurnal periodicity under climatic conditions such as ours, where great fluctuations of temperature occur in the course of the 24 hours.

Lastly, it may be mentioned, that I also undertook some measurements of the growth in length of the bean stem. These showed, in spite of the smaller growth, a similar diurnal periodicity determined by the temperature to that found earlier (l. c.) in the case of the hops.

4. Résumé.

In experiments with vigorous 3-year old hop plants, which were firmly rooted in an open glass (cold) house, the stems were found to show, during May-June, a rotational movement amounting on an average for 1 — 2 weeks' observations to ca. 120^0 per hour or $^1/_3$rd of the rate of the minute hand of the clock (Table I).

On closer study the rotational movement proved like the growth in length to have a very distinct daily periodicity, the rate being greatest during the day, least at night. Further, the experiments showed, that this daily periodicity is determined by external factors, among which the temperature is of such dominating importance, that its variation under natural conditions is determinative for the rate of rotation (see Table II and Plate IV).

A graphic comparison of the fluctuations in the rate of rotation and degree of humidity shows, that there is no connection between them under the natural conditions prevailing when the observations were carried out (see fig. 1).

From Laboratory experiments in June with pot-plants, which were placed alternately in the light and dark, under otherwise uniform external conditions as far as possible, it appeared, that

the rotational movement is not different, at any rate not essentially different, in the dark and in scattered daylight (Table II).

Experiments carried out in a cellar with constant low temperature showed, that the minimum temperature for the rotational movement, just as for the growth in length, lies in the neighbourhood of 4^0 (Tables III and IV).

An endeavour has been made, with the minimum temperature as starting-point, to obtain an expression of the relative quantities of heat, which were of importance for the rate of rotation under the main experiment. The numbers obtained, which are called "active quantities of heat" (cf. fig. 2), show, that there is a very complete agreement between fluctuations in these and in the rate of rotation, the fluctuations showing a perfect synchronisation under the conditions observed (Table VI and Plate IV)

A comparative experiment with twining bean-plants showed, that quite a similar daily periodicity in the growth in length and rate of rotation of the stem can also be seen in them and is also determined here by the temperature. It is probable, that the growth movements in many plants living under climatic conditions such as ours, where great temperature fluctuations occur in a diurnal period, have a diurnal periodicity which follows that of the temperature (see fig. 3).

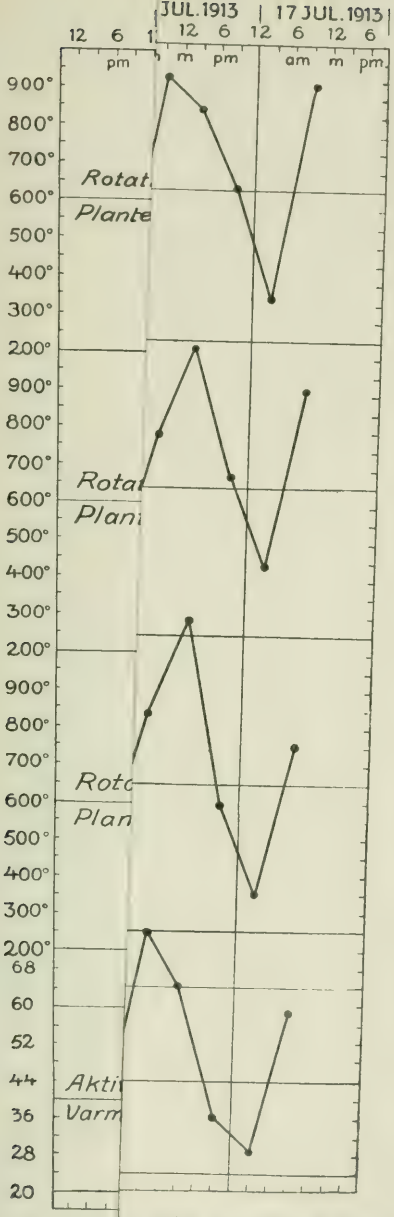


Fig. 3. Graph[illegible]he active quantities of heat determining th[illegible]st the „active quantities of heat« are calc[illegible]t as in hops has a marked

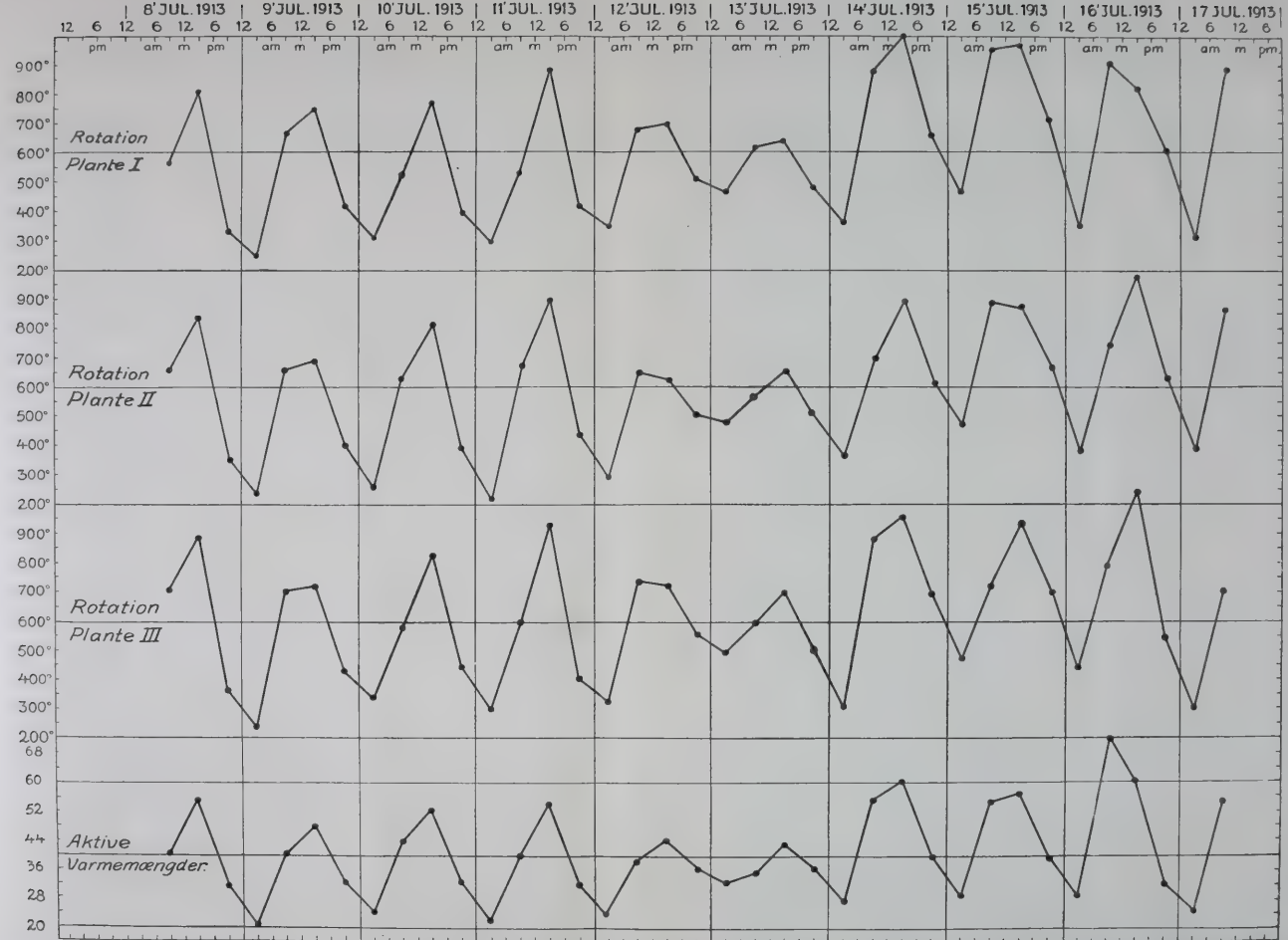


Fig. 3. Graphic representation of the rotational movement in stems of 3 twining bean plants during the period July 8th to 17th 1913 and of the active quantities of heat determining the rate of rotation during that period. The rotation of the 3 plants (I, II, III) is indicated in degrees for 6 hours' periods, whilst the ,,active quantities of heat« are calculated in the manner represented in fig. 2. The figure shows, that under naturel conditions the rate of rotation in beans just as in hops has a marked diurnal periodicity, the course of which is determined by the fluctuation of the temperature.

RECHERCHES
SUR LES ORGANISMES DE FERMENTATION

PAR

ALB. KLÖCKER.

II.

Recherches sur 17 formes du «Saccharomyces apiculatus».

(Planches II—VIII).

I. RÉSUMÉ DES RECHERCHES ANTÉRIEUREMENT FAITES SUR LES CARACTÈRES PROPRES A LA CLASSIFICATION DU «SACCH. APICULATUS».

AVANT de procéder à la description de mes propres recherches, je vais résumer brièvement ce que les savants qui nous ont précédé dans l'étude du «Sacch. apiculatus», ont dit d'important relativement aux caractères systématiques qui le distinguent. Les millésimes et les numéros mis entre parenthèses [ ] renvoient à la liste de la littérature traitant ce sujet qui fera suite à ce mémoire.

Forme et grandeur des cellules. Lorsque, dans ces exposés, la forme de la cellule est mentionnée, on ne parle jamais des conditions dans lesquelles se trouvait la cellule au moment où elle a été observée. Et cependant, ainsi que l'on pourra en juger par les descriptions qui vont suivre, le rôle que jouent l'âge d'une cellule, le milieu nourricier et la température à laquelle elle est cultivée, est d'une extrême importance pour la forme de la cellule; aussi, quand on en tient compte, cette forme devient-elle un caractère très important. Hansen seul /*1881* N° *8*/ donne sur ce sujet des renseignements détaillés. Reess /*1870* N° *1*/ dit que les cellules du S. apic. sont en forme de citron et que les jeunes bourgeons sont ellipsoïdes; cette déclaration est reprise par Engel /*1872* N° *3*/. Hansen /*1881* N° *8*/ dit que les cel-

lules de ce champignon sont en forme de citron et qu'il s'en détache deux sortes de bourgeons: les uns en forme de citron qui apparaissent au commencement du bourgeonnement; les autres, qui sont ovales, se forment à un stade plus avancé. Plusieurs bourgeonnements sont necessaires pour amener les cellules ovales a prendre la forme de citron. Hansen parle encore plus tard de cette variation dans la forme cellulaire *[1895 N° 26]*. Meissner *[1901 N° 40]* est d'avis que la forme ovale de la cellule du S. apic. est la forme normale, et que la forme pointue n'est autre que la forme du bourgeonnement de la cellule ovale, les pointes etant le commencement des bourgeons. Rommel *[1902 N° 43]* a fait des expériences sur deux formes de S. apic. dont les cellules étaient différentes de forme et de grandeur. En outre de celles en forme de citron, il en a trouvé des rondes ainsi que des ovales dont l'une des extrémités était très pointue. Chapman *[1904 N° 46*, et *1906 N° 53]* représente deux formes de S. apic. dont l'une est deux fois plus grande que l'autre. Schander *[1904 N° 48]* a comparé entre elles 24 formes de S. apic. Quelques-unes étaient courtes et épaisses, d'autres minces et allongées. ce qui rendait la forme de citron moins nettement accusee. Ces formes différaient aussi quant à leur dimension. Lindner *[1905 N° 50]* décrit le genre Hansenia auquel, sans ajouter d'autre commentaire, il rapporte le S. apic. comme ayant des cellules en forme de citron. Müller-Thurgau *[1906 N° 54]* ne partage pas l'avis de Meissner: il n'admet pas que la forme ovale des cellules du S. apic. soit la forme normale.

Les facteurs qui ont une influence déterminante sur la forme des cellules — l'âge, le milieu nourricier et la température à laquelle les cellules sont cultivées, — exercent cette même influence sur leur grandeur. Selon Reess *[1870 N° 1]*. l'épaisseur des cellules est de 2—3 μ, leur longueur de 6—8 μ; Hansen *[1881 N° 8]* est, somme toute, du même avis quand il dit que leur longueur est de 4,5 à 9 μ, le plus souvent de 7 μ. Mach et Portele *[1892 N° 19]* ont trouvé des cellules dont l'épaisseur était de 1,6 à 2,2 μ et la longueur deux fois plus grande, et d'autres cellules qui étaient très longues, mesurant de 8 à 17 μ, mais qui, par contre, n'avaient qu'une épaisseur de 1 μ. Lendner *[1900 N° 38]* mentionne une forme de S. apic. dont l'épaisseur des cellules était de 2 à 3 μ, et la longueur de 4 à 6 μ, tandis que chez une autre forme, l'épaisseur en était de 3 à 4 μ et la lon-

gueur de 6 à 8 μ; Rommel *[1902 N° 43]* en a trouvé ayant une longueur de 8 μ, et Rose *[1910 N° 63]* en mentionne dont l'épaisseur est de 3,5 à 4,5 μ et la longueur de 7 à 9 μ. D'autres savants ne parlent qu'en général de la forme et de la grandeur des cellules du S. apic.

On trouvera plus loin, dans ma description d'une espèce formant des spores — partant, un vrai Saccharomycète —, des renseignements sur la formation de spores. Comme on le sait, Reess n'a pas trouvé de spores chez le S. apic. Je me bornerai d'ailleurs ici à attirer l'attention sur les ouvrages suivants ayant trait à cette question: Engel *[1872 N°s 3 et 4]* qui croit avoir découvert chez le S. apic un genre de fructification tout nouveau, Hansen *[1881 N° 8,* et *1883 N° 10]*, Beijerinck *[1894 N° 23]* qui a remarqué pour la première fois de véritables spores chez le S. apic., Lindner *[1903 N° 45, 1904 N° 47, 1905 N° 51,* et *1907 N° 55]* qui croit avoir observé des «corpuscules ressemblant à des spores». Röhling *[1905 N° 52]* dont les observations se sont trouvées être inexactes, et, finalement, Klöcker *[1910 N° 62]* qui retrouve les spores signalées par Beijerinck et qui, en outre, en observe la germination, sur laquelle il donnera de plus amples détails dans ce mémoire-ci.

La force de résistance des cellules vis-à-vis de températures différentes peut aussi avoir son importance comme caractère de classification. Toutefois, quelques-unes des indications antérieurement données sont sans intérêt aucun, par suite de l'ignorance dans laquelle elles nous laissent au sujet de l'état des cellules sur lesquelles les expériences ont porté, et, en général, des conditions dans lesquelles l'influence de la température s'est fait sentir. Boutroux *[1883 N° 9]* qui est le premier à donner une indication relative à cette question, dit seulement que le S. apic. est tué à la température de 52°. Kayser *[1890 N° 15]* indique 45° comme étant la limite de température pour la levure humide. Martinand *[1891 N° 17]*, ayant mis dans de l'eau des cellules en suspension, trempa dans ce mélange d'eau et de levures des grains de raisins, qui furent ensuite exposés au soleil à des températures différentes. Mais, comme ici c'est surtout le soleil qui agissait, ces essais n'ont point d'importance au point de vue de l'influence de la température même. Laschè[1].

[1]) Will s'est servi d'un procédé analogue pour des recherches concernant d'autres cellules de levure.

[1893 N° *22]* fit chauffer pendant vingt minutes des cellules jeunes dans une eprouvette contenant du moût de bière: dans ces conditions, elles supportèrent la température de 40°, mais elles périrent a 45°. Comme on le verra plus tard, j'ai employé le même procédé; mais, bien qu'observant toutes les précautions nécessaires, je n'ai cependant pas toujours obtenu des résultats concordants. Berlese *[1896* N° *34]* est arrivé à constater que le S. apic. peut supporter 57° à l'air libre; mais il ne donne là-dessus aucuns détails. Muller-Thurgau *[1896* N° *35]* dit qu'une race de S. apic. fut tuée après un séjour de dix minutes dans du moût de raisin à la température de 50°, tandis que d'autres races supportèrent un séjour d'une égale durée à 55°.

La plupart de ces savants se sont surtout occupés de la question touchant la façon dont le S. apic. se comporte vis-à-vis des différentes espèces de sucre. Le premier qui a fait des constatations là-dessus est Hansen *[1880* N° *7*, et *1881* N° *8]*; il démontre que cette levure, qui fait fermenter le dextrose, reste sans action sur le saccharose, du fait qu'elle ne contient pas d'invertine, ce qui a été confirmé par tous les savants qui, après lui, se sont occupés de cette question. J'ai été le premier *[1910* N° *62]* qui aie trouvé des espèces de levures renfermant de l'invertine. Je les trouvai, au nombre de neuf, dans de la terre provenant de certaines régions tropicales, et j'en ferai la description dans ce mémoire. Des savants antérieurs, Nastukoff *[1895* N° *29]* est le seul qui ait dit que le S. apic., après un séjour de 15 jours dans une solution à 15 pour cent de saccharose, formait 3,9 pour cent d'alcool en volume. Il est probable cependant qu'ici il y ait une erreur (une faute d'impression, peut-être?); ou bien, c'est une nouvelle forme de S. apic. que Nastukoff aura examinée, supposition qui toutefois ne me paraît guère admissible, étant donné que les formes que j'ai découvertes plus tard et qui provoquent l'inversion, provenaient toutes des tropiques. Nastukoff ne parle pas d'inversion. Alors que, dans une solution de saccharose, des neuf espèces renfermant de l'invertine que je décrirai dans ce mémoire, huit forment d'assez grandes quantités d'alcool, une seule n'en produit qu'une faible trace.

Tous les savants avaient été unanimes à admettre que le S. apic. ne pouvait pas faire fermenter le maltose, jusqu'à ces derniers temps où il me fut donné *[1911* N° *64]* de découvrir

quelques espèces pouvant en faire fermenter de très petites quantités, fait sur lequel je donnerai plus loin des détails. On peut croire que Kohl *[1908* N° *56]* fait erreur quand il dit à un endroit de son livre que le S. apic. fait fermenter le maltose, alors que, à d'autres endroits, il dit que cette levure n'en a pas le pouvoir.

Quant à la manière dont le S. apic. se comporte vis-à-vis du d-galactose, les avis ont été partagés, probablement par suite du fait que le d-galactose du commerce renferme de petites quantités de dextrose dont il n'a pas été suffisamment débarrassé avant les expériences. Voit *[1892* N° *20]*, Fischer et Thierfelder *[1894* N° *24]*, Bau *[1896* N° *32]* et Armstrong *[1905* N° *49]* disent tous que le S. apic. ne peut pas faire fermenter le d-galactose. Henneberg *[1902* N° *42]* qui a observé une fermentation dans de l'eau de levure additionnée de galactose, dit plus tard *[1909* N° *59]* que le S. apic. ne peut pas faire fermenter ce sucre. Lindner *[1900* N° *39*, et *1909* N° *60]* prétend, par contre, que cette levure a le pouvoir de faire fermenter le galactose; cependant, il cite aussi *[1900* N° *39]* des formes qui ne l'ont pas.

Cremer *[1892* N° *18*, et *1895* N° *25]* a été le premier qui a démontré que le S. apic. peut faire fermenter le d-mannose, ce qui plus tard a été confirmé. Cependant, Lindner *[1900* N° *39]* et Rose *[1910* N° *63]* signalent des formes de cette levure qui n'en sont pas capables. Mais de ceci il ressort que les levures appelées S. apic. sont des espèces différentes. Toutes les formes de S. apic. que j'ai essayées ont été capables de faire fermenter le d-mannose.

Très différentes aussi sont les indications données par les savants sur la quantité d'alcool que peut produire le S. apic. Nulle part dans la littérature existante, on ne trouve des essais comparés du genre de ceux que je fais paraître dans ce mémoire. La plus grande quantité d'alcool formée que l'on trouve indiquée dans les mémoires connus, est à peine de 5 pour cent en volume, et, en général, on dit que le S. apic. ne supporte pas le séjour dans un liquide qui en renferme une proportion de 4 pour cent en volume. Comme on le verra, parmi les espèces que je décris plus loin, il s'en trouve qui forment de l'alcool en de beaucoup plus fortes proportions. On trouvera des renseignements sur la quantité d'alcool produite par le S. apic. dans des conditions

différentes, dans les ouvrages suivants: Hansen *[1880* N° *7, 1881* N° *8,* et *1888* N° *13]*, Boutroux *[1883* N° *9,* et *1884* N° *11]*, Amthor *[1888* N° *12,* et *1891* N° *16]*, Rietsch et Herselin *[1895* N° *30]*, Lendner *[1900* N° *38]*. Seifert *[1901* N° *41]*, Wortmann *[1902* N° *44]*, Schander *[1904* N° *48]* et Seiss *[1908* N° *58]*.

Dans ce qui va suivre, je parlerai d'abord de mes expériences sur seize espèces qui ne forment pas de spores et que je proposerais de réunir sous le nom générique de Pseudosaccharomyces, dénomination qui, du reste, a été employée par Van Laer *[1893* N° *21]* en parlant du S. apic., et qui me semble pratique pour plus d'un motif, ne serait-ce, entre autres, que parce qu'elle se rapproche de l'ancien nom.

Pour terminer, j'exposerai mes recherches concernant une espèce formant des spores (Hanseniaspora valbyensis).

II. MES NOUVELLES RECHERCHES.

1. Expériences relatives à des espèces ne formant pas de spores (Pseudosaccharomyces).

A. Recherches physiologiques et morphologiques.

a. Espèces renfermant de l'invertine.

Dans un travail provisoire *[1910* N° *62]*, j'ai mentionné la découverte que j'avais faite de plusieurs formes du S. apic. qui avaient une teneur en invertine[1]). Parmi une soixantaine de végétations que j'avais cultivées, il se trouva neuf formes qui renfermaient de l'invertine, et de ces neuf, quatre provenaient de Java[2]), deux de St Thomas (Antilles danoises), deux de Ste Croix (Antilles danoises) et une de l'Himalaya. Les autres formes, à savoir, huit de Java, une de St Thomas, une de l'Himalaya, quatre de l'Algérie, une des Alpes Autrichiennes, une du Harz, une de la Hollande, et le reste, du Danemark, n'avaient pas d'invertine.

La plupart des formes chez lesquelles je venais de constater la présence d'invertine, avaient précédemment déjà été examinées

[1]) Comparer la communication de Nastukoff *[1895* N° *29]* résumée dans le chapitre précédent.

[2]) De Kruyff *[1908* N° *57]* n'a pas trouvé de S. apic. à Java.

à notre laboratoire sans que cet enzyme y eût été remarqué. La cause en avait été dans la méthode d'investigation employée alors. En effet, on s'était contenté de semer une portion de levure dans une eau de levure à 10 pour cent de saccharose, et de mettre la culture à la température de 25°, puis, de rechercher après un à trois jours de repos, si la liqueur réduisait la liqueur de Fehling. Cette manière d'opérer n'était toutefois pas suffisante, car il arrive souvent que le sucre interverti qui a été formé est fermenté aussi vite qu'il est formé[1]), sans que des phénomènes de fermentation se soient manifestés. On ne peut obtenir une réduction de la liqueur de Fehling aussi longtemps que la formation de sucre interverti et sa destruction ont lieu en même temps, c'est-à-dire aussi longtemps que toute la quantité de sucre interverti formée est consommée; mais cela est parfois très long. L'épreuve par la liqueur de Fehling s'opère de la manière suivante: après avoir préparé une solution de 19 gr. d'hydrate de sodium et 52 gr. de sel de Seignette dans 150 gr. d'eau, et une autre composée de 10 gr. de sulfate de cuivre dans 150 gr. d'eau, on prend de chacune de ces solutions 2 cc., qu'on mélange dans un petit creuset en porcelaine et que l'on fait chauffer au gaz à une faible flamme, jusqu'au moment précis où commence l'ébullition. On éloigne alors le gaz, et on ajoute au mélange un cc. de la liqueur que l'on veut examiner. Une teneur en dextrose de 0,025 pour cent produit un précipité extrêmement faible de cuivre réduit. ce qui correspond à ce que, dans la suite, nous appellerons une trace. On pourra toujours démontrer sûrement la présence d'invertine en procédant comme nous l'avons fait pour les soixante végétations mentionnées plus haut: On lave la levure avec de l'eau jusqu'à ce que cette eau ne réduise plus la liqueur de Fehling; puis on triture la levure ainsi lavée avec du sable et de l'eau dans un mortier pendant cinq minutes environ, pour l'ajouter ensuite à une solution aqueuse à 10 pour cent de saccharose et saturée de toluène. Le tout est placé à une température d'environ 50°, et après une à deux heures de repos (rarement plus), le mélange, pour peu qu'il s'y trouve de l'invertine, aura réduit la liqueur de Fehling.

Pour plus de facilité, je désigne provisoirement par les dénominations qu'elles avaient au Laboratoire au cours des ex-

[1]) Schiönning a aussi constaté ce fait chez une Torula (Comptes-rendus du Laboratoire de Carlsberg, **7**, 138 (1908)).

periences, les neuf formes chez lesquelles j'ai constaté à l'aide du procédé décrit plus haut, la présence d'invertine, savoir: Java 403, Java 104, Java 104 a, Java 105, St Thomas 103, St Thomas 208, Ste Croix 1, Ste Croix 409 et Himalaya 1. Les essais ont tous été faits avec des cultures issues de cellules uniques.

Bien que les résultats des premiers essais se soient plus tard montrés inexacts, je ne les mentionnerai pas moins ici, car ils sont instructifs à plus d'un égard, et ils montrent combien faciles sont les erreurs. Dans tous ces essais, on procéda, immédiatement après l'ensemencement, à l'épreuve relative à la réduction de la liqueur de Fehling, et, dans les matras de contrôle dont on s'est servi pour toutes les séries d'expériences, il n'y avait pas de semence, mais la même liqueur que celle employée pour les essais.

1ère Série.

Les végétations ensemencées provenaient de cultures faites dans du moût de bière. Les essais eurent lieu à la température de 25° dans une eau de levure à 10 pour cent de saccharose (L-S)[1]), et dans une solution aqueuse à 10 pour cent de saccharose (S)[1]). Le signe + signifie que la liqueur de Fehling a été réduite, ÷ qu'elle ne l'a pas été.

	Réduction dans L-S.	Réduct. dans S.		Fermentation visible dans L S.	Fermentation visible dans S.
Java 403	÷	÷	+		+ (très faible)
Java 104	÷	÷	+	(extrêmement faible)	+ (faible)
Java 104a....	÷	÷	÷		÷
Java 105	÷	÷	+	(faible)	+ (faible)
St Thomas 103	÷	÷	+	(faible)	+ (faible)
St Thomas 208	÷	÷	+	(faible)	+ (faible)
Ste Croix 1 ...	÷	÷	+	(faible)	+ (faible)
Ste Croix 409.	÷	÷	÷		÷
Himalaya 1 ..	÷	÷	+	(extrêmement faible)	÷

Ainsi donc, on put constater que, bien que toutes ces formes, lorsqu'elles sont triturées avec du sable et mises dans de la saccharose saturée de toluène à 50°, réduisent très fortement la liqueur de Fehling au bout d'une à deux heures, aucune n'accusait la présence de sucre interverti quand la levure était en-

[1]) Pour plus de facilité, j'emploierai ces abréviations dans les tableaux suivants.

semencée de la manière usuelle dans une solution de saccharose. Dans la plupart des cas, on a pu remarquer une faible fermentation.

D'autres essais donnèrent un autre résultat, et, à titre d'exemple, nous citerons les essais suivants, qui furent également effectués à la température de 25°.

2ème Série.

	Réduction dans L-S.	Réduction dans S.	Fermentation visible dans L-S.	Fermentation visible dans S.
Java 403	+	+ (très faible)	+	+
Java 104 a	+	+	+	+ (faible)
St Thomas 103	+	+	+	+
Ste Croix i.....	+	+	+	+
Ste Croix 409 ..	÷	÷	÷	÷

Dans cette série-ci, sur cinq formes examinées, les résultats ont donc été pour quatre d'entre elles juste le contraire de ceux obtenus dans la première série, malgré que les cellules aient été engendrées de la même manière dans du moût de bière.

3ème Série.

En même temps, nous avons effectué une nouvelle série de recherches à la température de 35 à 38°, avec des cellules engendrées dans du moût:

	Réduction dans L-S.	Réduction dans S.	Fermentation visible dans L-S.	Fermentation visible dans S.
Java 403.....	+	+	+	+ (très faible)
Java 104 a ...	+	+ (très faible)	+	+
St Thomas 103	+	+	+ (très faible)	+ (très faible)
Ste Croix i ...	+	+	+ (très faible)	+ (très faible)
Ste Croix 409.	+	÷	÷	÷

A cette température élevée, il y eut donc dans les matras où la Ste Croix 409 avait été ensemencée dans l'eau de levure au saccharose, une quantité de sucre interverti telle qu'il en résulta la réduction de la liqueur de Fehling.

4ème Série.

Une expérience analogue fut instituée à la température de 35 à 37° avec les trois formes ci-dessous nommées; mais cette fois-ci, la culture avait été préalablement opérée dans une eau de levure additionnée de 2,5 pour cent de dextrose:

	Réduction dans L-S.	Réduction dans S.	Fermentation visible dans L-S.	Fermentation visible dans S.
Java 105	÷	÷	÷	÷
St Thomas 208 ...	+	+	÷	÷
Himalaya 1	+	+	÷	÷

5ème Série.

Par suite de ces résultats contradictoires, et dans le but d'en rechercher la cause exacte, je procédai à une longue suite d'expériences avec les neuf formes mentionnées plus haut. On pouvait penser, entr'autre, que les cellules d'une même espèce se comportaient différemment, ou aussi, que la culture préalable de ces cellules pouvait avoir une influence sur la quantité des enzymes contenus dans les cellules. C'est pourquoi je me décidai à isoler de chaque espèce un certain nombre de cellules et de faire l'essai avec les végétations qui en seraient issues. A cet effet, je disséminai sur du moût gélatiné des cultures vieilles d'un an, engendrées dans du moût, puis je transportai dans du moût dix colonies de chaque espèce. Au bout de quarante-huit heures, je décantai le moût, et, afin d'en éliminer jusqu'aux derniers restes, je lavai la levure avec de l'eau de levure à 10 pour cent de saccharose, laissant le tout vingt-quatre heures à la température de 25°[1]), après quoi le liquide fut éliminé — à l'aide d'une pipette — de la levure déposée, qui fut ensuite transférée dans un ballon Pasteur de la capacité de 1/8 de litre rempli d'eau de levure à 10 pour cent de saccharose, et les cultures furent placées à la température de 25°. Les dix végétations de chacune des espèces

[1]) Ce lavage à l'eau de levure additionnée de saccharose n'était pas heureux, car dans des essais ultérieurs je pus constater que le pouvoir d'intervertir peut en être considérablement affaibli; on peut parfois obtenir une forte réduction la première fois que les cellules sont cultivées dans l'eau de levure au saccharose, et la seconde fois, aucune. v. Euler et D. Johansson sont également arrivés au résultat qu'un mélange de levure et de sucre de canne tend à abaisser la teneur en invertine (Zeitschr. f. physiol. Chemie, **76**, 388 (1912)).

soumises à ces expériences, sont désignées dans le tableau ci-dessous par les lettres a—k.

Les différentes grosseurs des + indiquent approximativement les différents degrés de la force avec laquelle la réduction de la liqueur de Fehling a eu lieu: c'est ainsi que + marque une réduction très faible, + une réduction un peu plus forte, et + une forte. Les matras de contrôle n'en donnèrent pas.

Java 403.

Réduction suivant le nombre de jours:

	1	2	4	7	9	14	23
a.....	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷
b	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷
c.....	÷	÷	÷	+	+	+	÷
d	+	+	÷	+	+	+	+
e.....	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷
f.....	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷
g	÷	÷	÷	÷	÷	+	÷
h	+	+	÷	+	+	+	+
i.....	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷
k	÷	÷	÷	+	+	+	+

La végétation c ayant été également essayée à 37°, donna + au bout d'un jour; de même, au bout d'un jour à 50°.

Java 104[1]).

Réduction suivant le nombre de jours:

	5	7	9	12	14	16	18	20	25	33
a	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷
b	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷
c	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷
d	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	+	÷	+
e	÷	÷	÷	÷	÷	+	÷	÷	÷	÷
f.....	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷
g	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷
h	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷
i.....	÷	÷	÷	+	+	+	+	+	+	÷
k	÷	÷	÷	+	+	+	÷	÷	÷	÷

La végétation a ayant été essayée en même temps à 37 et 50°, donna dans les deux cas une réduction + au bout de 24 heures.

[1]) Le résultat de la 6ème série d'essais nous fit voir plus tard que ce n'était pas heureux de ne faire le premier examen qu'après cinq jours.

Java 104 a.

Les dix végétations de cette levure furent examinées après 3, 4, 6, 8, 11, 15, 22 et 29 jours; aucune ne donna de réduction. Le matras qui renfermait la végétation c s'étant brisé vers la fin de l'expérience, cette végétation ne put être employée pour la 6ème série d'essais.

A 37°, a donna ÷ après vingt-quatre heures et + après quarante-huit heures, à 50° après vingt-quatre heures, +.

Java 105.

Les dix végétations de cette levure furent essayées au bout de 5, 7, 10, 13, 17, 25 et 32 jours, et ne donnèrent toutes pas de réduction. A 37°, la végétation a ne donna de réduction ni après vingt-quatre heures, ni après quarante-huit; il en fut de même à 50°.

St Thomas 103.

Réduction suivant le nombre de jours:

	5	6	8	10	11	14	17	20	25	33
a	÷	÷	÷	÷	÷	÷	+	+	÷	+
b	÷	÷	÷	÷	÷	+	+	÷	÷	÷
c	÷	÷	÷	÷	÷	+	÷	÷	÷	+
d	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷
e	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷
f	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷
g	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷
h	÷	÷	+	+	+	÷	÷	÷	+	+
i	÷	÷	÷	+	+	÷	÷	÷	÷	÷
k	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	+

La végètation a ayant en outre été essayée à 37°, on constata + au bout d'un jour, + au bout de deux, et à 50° au bout d'un jour +.

St Thomas 208.

Toutes les dix végétations furent essayées après 1, 3, 5, 8, 15 et 23 jours; elles donnèrent toutes ÷. A 37°, a donna + au bout de vingt-quatre heures, + au bout de quarante-huit, à 50° + au bout de vingt-quatre heures, et après quarante-huit, +.

Ste Croix i.

Réduction suivant le nombre de jours:

	5	6	7	8	12	15	17	25	34
a.....	⊹	⊹	+	+	+	+	–	+	÷
b.....	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷
c.....	⊹	+	+	+	+	+	+	+	+
d.....	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷
e.....	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷
f.....	⊹	⊹	⊹	⊹	+	+	+	+	+
g.....	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷
h.....	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷
i.....	⊹	⊹	⊹	⊹	+	+	+	+	+
k.....	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷

La végétation b fut en outre essayée à 37°; elle donna + au bout de vingt-quatre et de quarante-huit heures, à 50° au bout de vingt-quatre et de quarante-huit heures ⊹.

Ste Croix 409.

Les dix végétations furent essayées après 5, 7, 10, 15, 18, 24 et 32 jours; elles donnèrent toutes ÷. Ayant constaté après la fin de l'expérience que la végétation c était contaminée, je ne pus ainsi m'en servir pour la 6ème série d'essais.

La végétation a fut en outre essayée à 37 et à 50°; elle donna ÷ au bout de 1, 2, 4 et 5 jours.

Himalaya i.

Les dix végétations furent essayées après 2, 4, 7, 10, 14 et 25 jours; elles donnèrent toutes ÷. A 37°, a donna au bout d'un jour ÷, au bout de deux ⊹; à 50°, au bout de vingt-quatre heures +, au bout de quarante-huit ⊹.

En reproduisant ici cette série d'essais, notre but a été de montrer comment les cellules d'une seule et même espèce peuvent être différemment influencées par le lavage à l'eau de levure additionnée de saccharose, et comment l'état des choses change selon la durée du temps que les cellules ont passé dans ce liquide. Il ne faut pas perdre de vue que, même quand il n'y avait pas eu de réduction de la liqueur de Fehling, l'inversion s'était néanmoins produite et qu'il y avait eu formation d'alcool.

Chez huit espèces, il s'en était formé d'assez grandes quantités; chez la levure Ste Croix 409 par contre, la proportion en avait été tellement minime qu'elle ne put être décelée qu'à l'aide de la réaction à gouttelettes de Pasteur avec la modification que j'y ai apportée[1]. Seules les levures Java 403, Java 104, Java 105, St Thomas 103, St Thomas 208 et Ste Croix 1 montrent des signes de fermentation; les autres n'en montrent aucun. Ces faits s'appliquent aux dix végétations de chacune des espèces.

Comme on l'a vu, la levure Ste Croix 409 avait pris une position à part; les dix végétations de cette espèce furent une fois de plus essayées au bout de quatre mois, mais aucune réduction ne se manifesta. Mais comme, d'un autre côté, la solution employée accusait une très faible quantité d'alcool, il faut croire qu'une réduction extrêmement faible avait cependant eu lieu. L'expérience terminée, la levure de dépôt fut triturée avec du sable et mise à 52° dans du saccharose saturé de toluène: au bout d'une heure et demie, cette solution avait réduit la liqueur de Fehling, ce qui nous donna la preuve que les cellules de la Ste Croix 409 renferment l'invertine.

Mais ce furent les végétations de la levure Ste Croix 1 qui se différencièrent le plus entre elles: des dix, quatre produisirent une très forte réduction, les six autres n'en produisirent pas du tout. Afin de rechercher maintenant si toutes les cellules de chacune de ces deux catégories se comportent de la même manière, on dissémina sur du moût de bière gélatiné deux végétations, une de chaque catégorie, c'est-à-dire une de b et une de i, et de chacune d'elles on enleva 25 colonies pour les transférer dans du moût de bière. Au bout de trois jours, on décanta le moût, et après avoir lavé la levure avec de l'eau de levure additionnée de saccharose, elle fut mise dans une nouvelle eau de levure à 10 pour cent de saccharose, comme on l'avait fait dans la 5ème série d'essais. Examinées chaque jour pendant une semaine, puis 15 jours plus tard, aucune des végétations issues de b ne montra de réduction. Des végétations issues de i, il y en eut deux qui ne donnèrent pas de réduction, tandis que les 23 autres en donnèrent une plus ou moins forte, la plupart, plutôt faible. Ces végétations avaient été examinées journellement pendant une semaine, puis trois jours plus tard et. finalement, au bout de

[1]) Comptes-rendus du Laboratoire de Carlsberg, **10**, 99 (1911).

vingt-deux jours en tout. A ce moment-là, huit d'entre elles (parmi lesquelles les deux susnommées) n'avaient pas produit de réduction, et celle que les autres avaient produite était extrêmement faible.

Les résultats de tous ces nombreux essais à 25° semblant ainsi montrer un état de choses assez compliqué, j'en vins à me demander si la culture préalable ne devait pas jouer un rôle dans ces phénomènes, si bien que, par suite, la quantité de sucre interverti formée, ou aussi la rapidité de sa destruction, n'en étaient pas influencées d'une manière où d'une autre. On n'a pas oublié que dans tous les cas précités, excepté celui de la levure Ste Croix 409, il s'était formé d'assez fortes quantités d'alcool. La présence d'invertine avait été démontrée par la trituration des cellules avec du sable. Un essai provisoire avait établi qu'une végétation qui donnait une forte réduction après une culture de vingt-quatre heures dans de l'eau de levure au saccharose, n'en donnait plus du tout après une culture ultérieure dans une nouvelle eau de levure également additionnée de saccharose. Comme justement les cellules employées dans la 5ème série de mes essais avaient été soumises à ce traitement, j'en conclus que c'était dans ce procédé opératoire qu'il fallait chercher la cause de tous ces résultats contradictoires.

6ème Série.

Conséquemment, j'entrepris une nouvelle série de recherches. Les végétations que j'employai étaient les mêmes que celles dont je m'étais servi pour la 5ème. Elles avaient séjourné 34 jours dans de l'eau de levure additionnée de saccharose, et ensuite deux mois dans du moût; on les mit alors rafraîchir dans du nouveau moût, où elles restèrent quatre jours à 25°. Au bout de ce temps, on décanta le moût aussi complètement que possible et on fit le lavage des cellules à l'eau stérilisée pendant vingt-quatre heures à 8°, puis la levure fut mise à 25° dans de l'eau de levure à 10 pour cent de saccharose. J'obtins les résultats suivants:

Java 403.

Au bout de vingt-quatre heures, les dix végétations donnèrent toutes ±, au bout de quatre jours, +.

Java 104.

Au bout de vingt-quatre heures, les dix végétations donnèrent toutes ±.

Java 104 a.

Comme le matras dans lequel était la végétation c s'était brisé à la fin de ma 5ème série d'essais, on n'essaya que neuf végétations. Au bout de vingt-quatre heures, toutes donnèrent ÷; au bout de six jours, i donna +, les autres ÷; au bout de quatorze jours, b donna +, i et k +, les autres ÷.

Java 105.

Au bout de vingt-quatre heures, toutes donnèrent ÷; au bout de six jours, a, b et k donnèrent +; au bout de seize jours, a, b, c, h et k donnèrent +, les autres ÷.

A 37 et 50°, a donna ÷ au bout de vingt-quatre heures; à 56°, au bout de vingt-quatre et de quarante-huit heures ÷.

St Thomas 103.

Au bout de vingt-quatre heures, toutes donnèrent +; au bout de trois jours, b et f donnèrent +, les autres +.

St Thomas 208.

Au bout de vingt-quatre heures, toutes les végétations donnèrent +; au bout de trois jours, elles donnèrent toutes +.

Ste Croix i.

Au bout de vingt-quatre heures, toutes donnèrent +.

Ste Croix 409.

Après 1, 5 et 18 jours, les neuf végétations de cette levure (c avait été contaminée à la fin de la série d'essais précédente) donnèrent ÷; a donna à 37° au bout de quatre heures +, au bout d'un jour +, et à 50° au bout de quatre heures + et au bout d'un jour +.

Himalaya 1.

Au bout de vingt-quatre heures, toutes les végétations donnèrent ÷, au bout de cinq jours, également ÷; au bout de 19 jours i et k montrèrent +, e et f une trace extrêmement faible, les autres ÷.

Ainsi donc, il se trouvait maintenant que, après un séjour de vingt-quatre heures à 25° dans l'eau de levure au saccharose, les dix végétations de chacune des neuf espèces soumises à ces expériences se comportaient toutes entre elles d'une manière

identique. Les espèces, par contre, ne se comportaient pas de la même manière: les unes provoquaient la réduction, les autres pas. C'est ainsi que Java 104 a, Java 105, Ste Croix 409 et Himalaya 1 donnaient ÷ au bout de vingt-quatre heures; toutefois, après plusieurs jours, quelques végétations pouvaient montrer +, à l'exception de la Ste Croix 409, dont les neuf végétations continuèrent de montrer ÷.

C'est pourquoi, après avoir laissé séjourner les végétations pendant un temps assez long dans du moût, je procédai à de nouveaux essais avec Java 104 a, Java 105 et Himalaya 1, que je mis dans de l'eau de levure à 5, 10 et 25 pour cent de saccharose. Cette série-ci ne porta que sur une seule végétation de chaque espèce, à savoir celle qui, en son temps, avait été disséminée sur du moût gélatiné. Il se montra alors que Java 104 a et Himalaya 1 donnèrent +, tandis que Java 105 continua à montrer ÷.

J'obtenais ce résultat quand les végétations servant aux essais avaient été engendrées dans du moût de bière ou dans de l'eau de levure additionnée de maltose; si, par contre, la semence utilisée provenait d'eau de levure additionnée de dextrose, ou, comme nous l'avons dit plus haut, d'eau de levure additionnée de saccharose, le résultat était autre: dans ces deux cas, il se présentait de grandes irrégularités. Mais le fait que ce genre de culture — et surtout celle dans l'eau de levure additionnée de saccharose — a une influence aussi défavorable sur la formation d'invertine dans les cellules, va à l'encontre de la théorie d'acclimatation préconisée par divers savants ces derniers temps, théorie suivant laquelle les cellules cultivées dans l'eau de levure additionnée de saccharose devaient précisément renfermer en plus forte quantité l'enzyme nécessaire pour la fermentation du saccharose. Importante est aussi la proportion de levure employée pour l'ensemencement; car, si elle est très faible, la quantité de sucre interverti sera également faible, et quelquefois si faible qu'aucune réduction n'aura lieu.

Basés sur cette manière de voir, les essais que j'entrepris alors sur la façon dont ces neuf espèces se comportent vis-à-vis du saccharose, furent effectués comme suit: L'espèce cultivée dans du moût de bière ou de l'eau de levure additionnée de maltose, la levure de dépôt lavée à l'eau stérilisée à basse température (deux à trois lavages sont souvent néces-

saires et ensemencée en quantité abondante dans de l'eau de levure à 10 pour cent de saccharose à 25°. Immédiatement après l'ensemencement, on fit un essai avec la liqueur de Fehling pour vérifier la pureté du saccharose et s'assurer que la levure n'y avait pas apporté de sucre réducteur (ce qui sera le cas, si la levure n'a pas été suffisamment lavée). Cet essai montra que, au bout de vingt-quatre heures à 25°, Java 403, Java 104, St Thomas 103, St Thomas 208 et Ste Croix i ont **toujours** réduit la liqueur de Fehling; que Java 104 a et Himalaya 1 l'ont tout à la fois réduite et pas réduite, et que Java 105 et Ste Croix 409 n'ont jamais pu être amenées à le faire.

Si, au lieu d'être à 10 pour cent, la solution de saccharose est à 25 pour cent, Java 104 a et Himalaya 1 donnent une forte reduction au bout de quarante-huit heures; du moins ce fut le cas dans les essais, en petit nombre il est vrai, effectués par moi. Par contre, la solution de sucre concentrée n'eut aucune influence sur Java 105.

Le fait que la levure Java 105 ne peut jamais à 25° être amenée a former assez de sucre interverti pour que la solution puisse réduire au bout de vingt quatre heures la liqueur de Fehling, constitue vraiment un phénomène étrange. En effet, l'alcool qui se forme dans le liquide est une preuve que bien réellement il y a eu formation de sucre interverti, mais que ce sucre est fermenté. La circonstance que la solution abandonnée au repos peut dans quelques cas réduire la liqueur de Fehling, prouve que l'invertine a traversé les parois de la cellule. Or, c'est pourquoi, lorsque cette solution ne réduit pas la liqueur de Fehling, je n'en vois pas d'autre explication que celle-ci, à savoir: que le sucre interverti formé est fermenté aussi vite qu'il est formé. De plus, étant donné que, comme nous l'avons déjà dit, on trouve dans la littérature traitant ce sujet des auteurs qui estiment qu'une culture dans un liquide nutritif additionné de dextrose et de saccharose doit pouvoir provoquer dans les cellules une augmentation de la quantité d'invertine, je fis aussi des expériences sur ces bases; mais, dans aucun cas, je n'obtins de résultat positif.

Ici encore, la levure Ste Croix 409 occupe une position à part. Aux températures au-dessous de 37°, je n'ai pas pu, pour cette espèce, constater la présence de sucre interverti dans la

solution de saccharose, et cette levure, tant à 25 qu'à 37°, ne forme, au bout de onze jours, qu'une très faible proportion d'alcool dans l'eau de levure à 10 pour cent de saccharose. Il faut donc croire que les proportions de saccharose interverties sont extrêmement faibles, malgré l'abondance de l'invertine renfermée dans les cellules. Il est, en outre, singulier que cette espèce soit justement encore une de celles qui forment le plus d'alcool dans l'eau de levure additionnée de dextrose. C'est ainsi que dans une solution à 20 pour cent de dextrose, elle peut former 8,6 pour cent d'alcool en volume avec des phénomènes de fermentation fortement prononcés, ce qui fait que, apparemment, la teneur en invertine qu'a cette levure, ne lui profite guère quand elle est cultivée dans une solution de saccharose.

K. Saito[1]) a trouvé un état analogue chez la levure qu'il a décrite, le Saccharomyces Soya. Cette levure, en effet, qui, lorsqu'elle était triturée avec du sable, montrait de l'invertine, se refusait à faire fermenter le saccharose. Il est vrai que ce savant n'a pas vérifié s'il y avait eu formation d'alcool dans les cultures faites dans des solutions de saccharose; il se borne à dire que, dans ces cultures, le Saccharomyces Soya n'a pas développé de gaz. Il en est de même pour mon Zygosaccharomyces Priorianus. A l'époque où je décrivis l'espèce, j'essayai de rechercher sa teneur en invertine en semant cette levure dans de l'eau de levure additionnée de saccharose; mais je n'obtins pas de réduction de la liqueur de Fehling, et ne remarquai aucune fermentation, de sorte que, tout comme Hansen, j'en avais conclu que cette espèce ne renfermait pas d'invertine. Dans un récent mémoire de v. Richter[2]), on pouvait lire que le Zygosacch. Priorianus pouvait faire fermenter le saccharose, ce qu'il avait démontré par la «Kleingärmethode» de Lindner; mais on n'y trouvait aucune indication relative à une teneur en invertine. Je triturai alors des cellules de cette levure avec du sable et plaçai ce mélange à 50° dans une solution de saccharose saturée de toluène. Comme, au bout de quelques heures, ce mélange avait réduit la liqueur de Fehling, il est, par conséquent, hors de doute que cette espèce contient de

[1] Mikrobiologische Studien über die Soyabereitung. (Centralbl. f. Bakt., Par. u. Inf., 2. Abt., **17**, 106 (1907)).

[2] Über einen osmophilen Organismus, den Hefepilz Zygosaccharomyces mellis acidi sp. n. (Mycolog. Centralbl., **1**, 67 (1912)).

l'invertine; mais après avoir ensemencé dans de l'eau de levure additionnée de saccharose, on ne put constater d'inversion, même après un repos de dix jours à 25°. Dans ce dernier liquide, je pus déceler une trace d'alcool à l'aide de la réaction à gouttelettes, ce qui ne fut pas possible avec l'ébullioscope.

Voulant aussi connaître leur manière de se comporter vis-à-vis du Maltose, je fis à ce sujet un certain nombre de recherches avec les neuf espèces dont il est parlé dans ce qui précède. Comme on le sait, jusqu'ici on n'avait pas trouvé de forme du S. apic. pouvant fermenter le maltose. Aussi ne fus-je pas peu surpris en remarquant une formation d'alcool dans de l'eau de levure au maltose dans laquelle quelques-unes de ces espèces avaient été ensemencées. Il n'était toutefois pas question de phénomènes visibles de fermentation. Afin de débarrasser de sa teneur en dextrose le maltose[1]) qui devait servir à ces essais, je mis dans la solution stérilisée ajoutée à l'eau de levure, une culture pure du S. apic. qui se trouve ordinairement dans les vergers. Au bout de quelques jours, on sépara la levure par filtration, puis on stérilisa à nouveau la solution, pour y ajouter une nouvelle culture de S. apic. Si alors, au bout de quelques jours, on ne pouvait remarquer la présence d'alcool dans le liquide, celui-ci, après une nouvelle stérilisation, était employé pour les essais.

Pour l'ensemencement, on prit une abondante quantité — 2 centimètres cubes environ — de levure liquide soigneusement lavée, qui fut délayée dans 40 centimètres cubes d'eau de levure à 5 pour cent de maltose. Au bout de quarante-huit heures à 25°, Ste Croix 409 et St Thomas 208 donnèrent une forte réaction à gouttelettes, Java 104 une réaction marquée, et Java 104 a une faible; St Thomas 103 ne donna qu'une trace. Java 403, Java 105, Ste Croix 1 et Himalaya 1 n'accusèrent pas de réaction. Les liquides nutritifs des deux premières espèces furent alors distillés, et le distillat accusa la réaction à l'iodoforme de Lieben du fait que, au bout de vingt-quatre heures de repos, une franche odeur d'iodoforme

[1]) Comme dans les fabriques de produits chimiques, le maltose est purifié en le faisant recristalliser dans l'alcool, je pus, en faisant dissoudre le maltose dans de l'eau stérilisée, déceler la présence d'alcool à l'aide de la réaction à gouttelettes. C'est pourquoi, avant de s'en servir, il faut avoir soin de la faire bien bouillir.

se dégageait et qu'une faible quantité de cristaux d'iodoforme s'était formée. Par conséquent, il ne peut y avoir de doute qu'il ne se soit formé de faibles proportions d'alcool, qui ne pouvaient provenir que d'une fermentation de légères quantités de maltose. Un ballon de contrôle renfermant la même eau de levure au maltose, mais sans addition de levure, ne donna pas de réaction.

Au bout de cinq jours à 25°, on essaya les sept autres cultures, et, cette fois, non seulement Java 104, mais aussi Java 104 a et St Thomas 103 donnèrent une réaction bien prononcée; Ste Croix 1 et Himalaya 1 donnèrent une faible réaction, et Java 105, ainsi que Java 403, ne donnèrent pas de réaction. Avec Java 104, Java 104 a et St Thomas 103, on entreprit alors l'épreuve à l'iodoforme de Lieben. Le résultat en fut que Java 104 a donna une forte odeur d'iodoforme et une certaine quantité de cristaux d'iodoforme, tandis que Java 104 et St Thomas 103 produisirent une faible odeur d'iodoforme, mais point de cristaux. Au bout de sept jours, Ste Croix 1 et Himalaya 1 donnèrent à l'épreuve à l'iodoforme une très faible odeur d'iodoforme, mais pas de cristaux. Java 105 et Java 403 donnèrent cette fois toutes deux une réaction à gouttelettes bien accusée L'épreuve à l'iodoforme ne put être faite avec ces deux espèces parce que la totalité du liquide avait été employée pour opérer la réaction à gouttelettes.

Le ballon de contrôle ne donna toujours pas de réaction à gouttelettes.

Le résultat général de ces essais a donc été, que toutes les neuf espèces sont capables de fermenter de très faibles quantités de maltose.

On ne peut guère abandonner les cultures au repos plus de sept jours, sinon on risquerait de voir le ballon de contrôle donner aussi la réaction à gouttelettes. En fait, il en fut ainsi dans une série d'essais qui dura trois semaines. Antérieurement déjà[1]), j'ai signalé ce phénomène singulier que, abandonnée au repos, l'eau de levure est à même de donner la réaction à gouttelettes.

Quant à la façon dont les neuf espèces considérées se comportent vis-à-vis des autres sucres, je dirai que toutes fermen-

[1]) Comptes-rendus des trav. du Laboratoire de Carlsberg, **10**, 99 (1911).

tent le dextrose, le lévulose et le d-mannose tout en développant des phénomènes de fermentation. Aucune d'elles ne peut fermenter le lactose ni le d-galactose. Ce dernier sucre, avant d'être employé, devra être purifié de la manière que j'ai indiquée pour le maltose, le d-galactose renfermant toujours une faible trace de dextrose.

Les neuf espèces en question se différencient tant par la quantité d'alcool qu'elles forment dans de l'eau de levure additionnée de saccharose, que par les phénomènes de fermentation qu'elles présentent, quelques-unes en montrant, d'autres pas. A titre d'exemple, je consigne ici une série d'essais.

Le pourcentage d'alcool en volume produit à la température de 17—20° dans de l'eau de levure à 10 pour cent de saccharose, est le suivant:

	Au bout de 14 jours	Au bout de 41 jours
Java 403	1,81	3,84
Java 104	1,84	3,84
Java 104 a	0,37	1,92
Java 105	1,92	3,48
St Thomas 103...	1,73	4,60
St Thomas 208...	2,35	4,35
Ste Croix 1	1,14	3,11
Ste Croix 409	une trace	une trace
Himalaya 1	0,63	1,51

Ces déterminations ont été faites à l'ébullioscope. A cette épreuve, la levure Ste Croix 409 ne montra pas de formation d'alcool; mais le liquide donna bien distinctement la réaction à gouttelettes de Pasteur.

On verra ci-après consignées dans une série d'essais, les quantités d'alcool formées par ces neuf espèces dans l'eau de levure additionnée de dextrose.

Ces quantités sont indiquées par le pourcentage en volume. L'abréviation L-D = eau de levure au dextrose, T-L = température du laboratoire.

	Dans L-D à 10 %		Dans L-D à 20 %					
	Après 10 jours à 17-20°	19 jours 17-20°	12-13 jours à 25°	1 mois 25°	3 mois 25°	20 jours T-L	39 jours T-L	70 jours T-L
Java 403	2,94	4,51	4,42	4,67	5,21			
Java 104	2,36	4,67	4,02	4,53	4,94			
Java 104a			1,57	1,69	3,07			
Java 105	3,11	4,72	4,16	4,28	4,53			
St Thomas 103 .	3,14	5,30	4,94	4,42	5,00	4,64	6,17	6,17
St Thomas 208 .	3,75	5,39	4,94	4,94	5,27	4,64	5,35	5,48
Ste Croix 1	1,92	3,51	3,90	4,16	5,54			
Ste Croix 409 ..	5,26	5,26	4,94	7,78	8,20	7,95	8,60	8,60
Himalaya 1....	0,88	1,61	2,47	2,47	5,35			

Ce tableau fait voir que la Ste Croix 409 se distingue en formant jusqu'à 8,60 pour cent d'alcool en volume: aucune autre ne peut atteindre ce chiffre. Cette levure est en outre celle qui fait fermenter le plus rapidement, tandis que Himalaya 1 est celle qui fait fermenter le plus lentement, et Java 104 a, celle qui donne la plus faible quantité d'alcool en volume.

D'après les recherches faites antérieurement par divers savants, le S. apic. serait une des formes qui, dans de certaines conditions, forment de l'acide en quantités passablement fortes. Afin de savoir si les neuf espèces qui nous occupent montreraient sous ce rapport des différences assez grandes pour que l'on doive tenir compte de la quantité d'acide formée pour la classification de l'espèce, je procédai à quelques séries d'essais.

Grotenfelt *[1889* N° *14]* ayant en son temps ensemencé le S. apic. dans du lait stérilisé qui avait été coloré en bleu par le tournesol, cette levure n'y développa pas assez d'acide pour faire prendre à ce liquide une coloration rouge, coloration qu'il obtint, par contre, avec des cultures faites dans le même liquide nutritif lorsque, dans celui-ci, il avait semé un Saccharomyces fermentant le lactose, le S. acidi lactici. Je fis ce même essai avec mes neuf espèces, mais dans aucun cas il ne se produisit une coloration en rouge, ce qui, par contre, arriva avec une culture de Sacch. fragilis, levure qui est capable de fermenter le lactose. Comme mes neuf espèces peuvent toutes fermenter de faibles quantités de maltose, j'ajoutai aux cultures de ces

espèces, une solution aqueuse stérilisée de maltose; mais dans ce cas non plus, il ne se produisit point de rougissement.

C'est alors que je me mis à rechercher si l'acide formé ne l'était pas en quantités différentes suivant les espèces et, à cet effet, je me servis comme liquide nutritif, d'une eau de levure a 10 pour cent de dextrose. Au bout de sept jours à 25°, je prelevai sur chaque ballon dix centimètres cubes de ce liquide nutritif pour les introduire dans une éprouvette, que je plaçai pendant une heure dans un bain-marie à 50°, afin d'en expulser l'acide carbonique présent. J'effectuai ensuite la titration à l'aide d'hydroxyde de sodium $^{n}/_{10}$, en me servant de phénolphtaléine comme réactif indicateur. Dans le tableau ci-après, j'ai indiqué en centimètres cubes la quantité d'hydroxyde de sodium employée, déduction faite du chiffre trouvé pour l'eau de levure. Les chiffres de ce tableau sont résultés de trois séries d'essais.

	Quantité, en cc., employée de Na OH $^{n}/_{10}$		
Java 403	1,1	0,9	0,9
Java 104	1,1	1,0	1,0
Java 104 a	1,1	0,8	0,9
Java 105	1,3	1,1	1,1
St Thomas 103 ...	1,35	1,0	1,0
St Thomas 208 ...	1,4	1,2	1,2
Ste Croix 1	0,9	0,9	1,1
Ste Croix 409	1,2	1,2	1,1
Himalaya 1	1,1	1,3	1,1

Comme on le voit, la différence est si faible qu'elle est sans aucune importance pour la classification.

Un caractère très important pour la classification des espèces sont les limites de températures entre lesquelles le bourgeonnement a lieu. Pour les neuf espèces considérées, la température maxima oscille entre 36—37° jusqu'à 39—40°, alors que la température minima se trouve entre 3—4° et 6—8°. Le tableau ci-après indiquera les températures maxima et minima de ces différentes espèces.

	Maximum	Minimum
Java 403.....	37—38°	3,5—6°
Java 104.....	38—39°	6—8°
Java 104 a	36—37°	6—8°
Java 105.....	36—37°	6—8°
St Thomas 103 ...	37,5—38,5°	6—8°
St Thomas 208 ...	37—38°	3—4°
Ste Croix 1.....	39—40°	3,5—6°
Ste Croix 409.....	37—38°	3,5—6°
Himalaya 1	37—38°	3—4°

Plusieurs savants ont, de temps en temps, indiqué des températures limites de la vitalité du S. apic. En général, ils n'ont rien dit des méthodes qu'ils ont employées pour leurs recherches, ni de l'état des cellules qui en faisaient l'objet, c. à. d. si elles étaient desséchées ou si elles se trouvaient dans un liquide nutritif. Leurs indications se bornent généralement à établir la température que le S. apic. peut supporter et celle à laquelle il est tué. Il ne faut pas s'étonner de la différence qui existe entre les données de ces savants relativement aux limites de la vitalité de cette levure, car elle dépend à un haut degré de l'état dans lequel se trouvent les cellules essayées, ainsi que de la façon dont on laisse agir la température sur les cellules.

A l'effet d'établir clairement ces limites de température, j'ai institué un certain nombre d'essais en procédant de la manière suivante:

Dans des éprouvettes stérilisées et fermées à l'aide d'un tampon de ouate, je mis dix centimètres cubes de moût de bière stérilisé, exactement le même pour chaque série d'essais. Ces éprouvettes furent alors placées dans un bain-marie ayant la température voulue, et lorsque le moût eut pris cette température (ce qui chaque fois fut vérifié à l'aide d'un petit thermomètre placé à cet effet dans le moût dans une éprouvette de contrôle) on sema dans chaque éprouvette deux gouttes d'une végétation en moût, végétation qui était très jeune, ordinairement âgée seulement de vingt-quatre heures. Avant l'ensemencement, on avait eu soin de bien secouer le ballon renfermant cette végétation de façon à répartir les cellules dans le liquide aussi uniformément que possible. Comme on le voit, la dose ensemencée était bien

faible. Les éprouvettes furent alors laissées pendant une demi-heure ou une heure entière dans le bain-marie, après quoi on les plaça à la température de 25°, afin de rechercher lesquelles de ces végétations avaient survécu à ce traitement. Afin d'obtenir que les cellules se trouvent dans un état aussi pareil que possible, les différentes levures, avant d'être ensemencées, avaient été rafraîchies à plusieurs reprises dans du moût, à vingt-quatre heures d'intervalle.

Malgré tous les soins apportés à entourer les neuf espèces de conditions tout à fait identiques, chaque espèce ne se comporta néanmoins pas, dans quelques cas, de la même façon dans les séries expérimentales correspondantes. Dans le tableau qui suit sont consignés les résultats de l'une des premières séries d'essais. Ici, de même que dans la suite, + signifie que l'espèce en question avait survécu au traitement, et ÷ qu'elle avait succombé. Lorsque, au bout de quatorze jours, la levure ne montrait aucun signe de vie, elle était considérée comme tuée.

1ère Série.

	Chauffées pendant une demi-heure à			
	42°	45°	48°	50°
Java 403.....	+	+	÷	÷
Java 104.....	+	+	÷	÷
Java 104 a	+	÷	÷	÷
Java 105.....	+	÷	÷	÷
St Thomas 103 ...	+	+	÷	÷
St Thomas 208 ...	+	÷	÷	÷
Ste Croix i	+	+	+	÷
Ste Croix 409	+	+	÷	÷
Himalaya 1	+	÷	÷	÷

Ainsi donc, les neuf espèces supportaient toutes le séjour d'une demi-heure dans du moût à 42°; par contre, il y en eut trois (Java 104 a, Java 105 et Himalaya 1) qui ne supportèrent pas la température de 45°, deux (Java 104 et Ste Croix i) qui supportèrent celle de 48°, mais aucune ne supporta 50°.

Afin de voir si cet état de choses était constant, j'effectuai tout à fait de la même manière une nouvelle série d'essais.

2ème Série.

	Chauffées pendant une demi-heure à				
	42°	45°	48°	50°	52°
Java 403	+	+	÷		
Java 104	+	+	÷	+	÷
Java 104 a.....	+	÷	÷		
Java 105	+	+	÷		
St Thomas 103..	+	+	÷		
St Thomas 208..	+	÷	÷		
Ste Croix i	+	+	÷		÷
Ste Croix 409 ...	+	+	+		
Himalaya 1.....	+	÷	÷		

Comme on le voit, les résultats de la deuxième série ne concordent pas tout à fait avec ceux de la première: Java 105 avait maintenant supporté la température de 45°, mais pas St Thomas 208; Java 104 et Ste Croix i n'avaient pas supporté cette fois-ci celle de 48°, alors que Ste Croix 409 la supportait, et, chose étrange, la Java 104 supportait 50°, bien qu'elle ait été tuée à 48° dans ma première série d'essais.

Voyant cela, il me vint à l'idée que, peut-être, ces irrégularités étaient dues à ce que, dans certains cas, les cellules qui avaient servi à l'ensemencement s'étaient ramassées en tas, et que, par conséquent, celles qui s'étaient trouvées au milieu du tas n'ayant pas subi suffisamment l'influence de la chaleur, n'avaient pas été chauffées à la température à laquelle l'essai avait lieu, aussi longtemps qu'elles auraient dû l'être. Chez quelques-unes de ces espèces, les cellules ont une tendance à se tasser, sans qu'il soit possible de les séparer en les secouant.

Pensant que l'on pourrait, en partie du moins, remédier à cet inconvénient en laissant agir plus longtemps la température pendant une heure, par ex., j'effectuai une série d'essais dont voici les résultats.

3ème Série.

	Chauffées pendant une heure aux temp. de			
	42°	45°	48°	50°
Java 403	+	÷	÷	÷
Java 104	+	+	÷	÷
Java 104 a	+	÷	÷	÷
Java 105	+	÷	÷	÷

	Chauffées pendant une heure aux temp. de			
	42°	45°	48°	50°
St Thomas 103	+	÷	÷	÷
St Thomas 208	+	+	÷	÷
Ste Croix i	+	+	÷	÷
Ste Croix 409	+	÷	÷	÷
Himalaya 1	+	÷	÷	÷

Ainsi donc, toutes supportèrent un séjour d'une heure dans du moût à 42°; il n'y en eut que trois (Java 104, St Thomas 208 et Ste Croix i) qui supportèrent 45°, et aucune ne supporta 48° (ni 50°).

Je répétai l'essai, qui donna alors les résultats suivants:

4ème Série.

	Chauffées pendant une heure aux temp. de		
	45°	48°	50°
Java 403	÷	÷	÷
Java 104	+	÷	÷
Java 104 a.....	÷	÷	÷
Java 105	÷	÷	÷
St Thomas 103.....	÷	÷	÷
St Thomas 208.....	÷	÷	÷
Ste Croix i.....	+	÷	÷
Ste Croix 409	+	÷	÷
Himalaya 1.....	÷	÷	÷

On le voit, les résultats de cette dernière série ne correspondaient également pas avec ceux de la série précédente. St Thomas 208 qui dans celle-ci avait supporté d'être chauffée pendant une heure dans du moût à 45°, ne le supportait pas cette fois-ci, tandis que Ste Croix 409, qui n'avait pas supporté cette température la première fois, la supportait maintenant. Java 104 et Ste Croix i se comportèrent d'une manière identique dans les deux séries d'essais.

Le chauffage prolongé ne donna donc pas la constance absolue que je cherchais à obtenir. Les deux espèces qui montraient des irrégularités, appartiennent à celles dont la levure de dépôt se forme en plaques et en tas; aussi, comme nous l'avons déjà dit, est-ce sûrement cette particularité qui cause cette anomalie. A proprement parler, il est tout à fait étrange que ces espèces, qui toutes proviennent des tropiques, montrent si peu

de résistance aux températures élevées. Nous parlerons plus tard d'espèces provenant de régions tempérées qui, sous ce rapport, se comportent d'une façon diamétralement opposée.

La forme qu'ont les cellules aux approches de la température maxima du bourgeonnement, constitue un des bons caractères requis pour la classification d'une espèce. Les cellules des neuf espèces qui nous occupent furent photographiées après un séjour de trois jours dans du moût à 35°. Mieux que par mots, les photographies que l'on trouvera reproduites sur les planches jointes à ce mémoire, feront voir la différence qui existe dans la forme des cellules, suivant que celles-ci proviennent de cultures à la température de 25° ou de celles à 35°.

On verra que Ste Croix 409 se différencie tout à fait des autres espèces. Alors que les cellules de cette levure provenant d'une culture vieille d'un jour dans du moût à 25° sont des cellules typiques du S. apic. (v. Planche VI, Fig. 29), et ont, en général, une longueur d'environ 8 μ et une largeur de 5 μ, ces cellules, dans du moût à 35°, sont, au bout de vingt-quatre heures déjà, transformées en cellules allongées, ayant la forme de boudin (v. Planche VI, Fig. 30), qui peuvent atteindre une longueur de 40 μ et une largeur d'environ 4 μ. Il s'en trouve aussi, et même en assez grand nombre, qui présentent des formes tout à fait bizarres.

J'ai suivi au microscope cette transformation intéressante. Dans une chambre Ranvier contenant du moût, j'ensemençai quelques cellules jeunes, typiques, ayant la forme de citron. Le microscope était placé dans un petit thermostat[1]), et pendant vingt-quatre heures, je pus suivre graduellement le gonflement et la transformation des cellules. Quelques-unes d'entre elles ne subirent pas ce gonflement, mais, au contraire, elles se ratatinèrent et périrent.

Si l'on place maintenant à 25° les cellules ainsi transformées à la température de 35° dans une chambre Ranvier contenant du moût, on les verra pousser des bourgeons. Les premiers

[1]) V. Alb. Klöcker, Die Gärungsorganismen in der Theorie und Praxis der Alkoholgärungsgewerbe, 2te Aufl., 1906, Fig. 17, p. 38.

bourgeons ne prennent pas tout de suite la forme typique de citron, ils ne font que s'en rapprocher, étant plus allongés. Par contre, les cellules qu'ils engendrent, donc la deuxième ou peut-être la troisième génération, prennent pour la plupart la forme de citron. On voit par là, qu'il faut plusieurs générations pour que les cellules reviennent à leur forme normale.

Somme toute, il semble que pour ces neuf espèces, la règle générale soit que les cellules deviennent plus grosses à 35° qu'à 25; mais, par ex. pour l'Himalaya 1, de même que pour la St Thomas 208, la différence est très peu sensible. A 35° les cellules de Ste Croix 1 sont plus arrondies, celles des autres le sont pour la plupart, ou quelques-unes des cellules accusent la forme de boudin. Mais, comme nous l'avons déjà dit, le meilleur moyen de se rendre compte de ces transformations, ce sera encore d'étudier les planches jointes à ce mémoire.

b. *Espèces ne renfermant pas d'invertine.*

Parmi les espèces qui ne renferment pas d'invertine, j'en ai soumis sept à des recherches approfondies. Dans ce qui suit, je désignerai ces espèces par les dénominations suivantes: P. H. 4—2, Alpes Autr., Akbau 12, B. 60 Java 201, Java 305 et Harz 3.

Concernant la manière de se comporter vis-à-vis des divers sucres, il a été constaté qu'elles peuvent fermenter le dextrose, le lévulose et le d-mannose, mais pas le saccharose, le d-galactose et le lactose. Deux de ces espèces, B. 60 et Akbau 12, peuvent fermenter de petites quantités de maltose, car, après ensemencement dans une solution à 5 pour cent de maltose dans de l'eau de levure, il se formait de petites quantités d'alcool, dont la présence pouvait être constatée à l'aide de la réaction à gouttelettes de Pasteur avec la modification que j'y ai apportée: Du reste, ces essais furent effectués de la même manière que ceux décrits pour le groupe précédent, avec du maltose purifié de même.

On verra par le tableau ci-dessous la quantité d'alcool que ces sept espèces arrivent à former dans l'eau de levure additionnée de dextrose.

Le tableau indique le pourcentage en volume de l'alcool formé. L'abréviation L-D désigne l'eau de levure au dextrose, T-L, la température du laboratoire.

	L-D à 10 %		L-D à 20 %	
	Après 10 jours à 17—20°	19 jours 17—20°	20 jours T-L	39 jours T-L
P. H. 4—2	3,00	4,94	4,13	5,52
Alpes Autr.	3,30	4,66	4,43	4,75
Akbau 12.....	5,20	5,27	8,27	8,76
B. 60.....	5,35	5,39	7,95	8,45
Java 201.....	3,17	3,66	2,58	3,84
Java 305.....	3,67	4,16	5,22	5,41
Harz 3	2,94	3,43	2,58	3,72

On le voit, les quantités d'alcool formées par Akbau 12 et B. 60, sont très considérables.

Dans du moût à 25° d'une concentration d'environ 13,8 pour cent Balling, ces sept espèces formèrent à la température ordinaire du laboratoire les quantités d'alcool en volume suivantes:

	Après 11 jours	21 jours	30 jours	90 jours
P. H. 4—2.....	0,73	0,88	0,93	0
Alpes Autr.	0,78	0,93	0,82	0
Akbau 12.....	0,83	0,82	0,82	0
B. 60.....	0,83	0,78	0,93	0
Java 201.....	0,83	0,82	0,78	
Java 305.....	0,83	0,86	0,67	
Harz 3	1,03	0,90	0,82	

On voit par là, qu'on n'est pas arrivé, au bout de trois mois, à constater à l'ébullioscope la présence d'alcool chez les quatre premières espèces. Les trois autres ne furent pas essayées à ce moment-là. Le résultat que j'ai obtenu ne concorde pas avec les observations faites autrefois, par Amthor, entre autres *[1891 N° 16]*, qui, précisément, insiste sur ce fait qu'il faut un temps extraordinairement long pour atteindre le maximum de la formation d'alcool.

Au bout de trois mois, Akbau 12 avait produit dans le moût une faible odeur d'éther de fruit, B. 60, une forte.

De même que les neuf espèces dont il est parlé dans le premier chapitre de ce mémoire, ces sept espèces-ci ont aussi été essayées sous le rapport de la formation d'acide. Le procédé opératoire fut exactement le même que celui décrit plus haut.

Aucune de ces espèces ne colora en rouge le lait coloré par le tournesol. Toutefois, après l'addition de maltose, Akbau 12 et B. 60 donnèrent cette coloration, et, sous ce rapport, ces deux espèces se différenciaient ainsi des autres. Il ne faut pas oublier que ces mêmes espèces peuvent faire fermenter de faibles quantités de maltose.

La titration de dix centimètres cubes du liquide nutritif (eau de levure à 10 pour cent de dextrose), donna les résultats suivants dans trois séries d'essais:

	Quantités, en cc., de Na OH $^{n}/_{10}$		
P. H. 4—2	1,3	1,4	1,3
Alpes Autr.....	1,5	1,5	1,3
Akbau 12.....	1,1	1,2	1,2
B. 60	0,9	1,0	0,8
Java 201	1,4	1,4	1,3
Java 305	1,4	1,4	1,4
Harz 3.....	1,0	1,0	1,0

Les limites de température pour le bourgeonnement de ces espèces dans le moût, sont comme suit:

	Maximum	Minimum
P. H. 4—2.....	36—37°	3,5—0,5°
Alpes Autr.....	35—36°	3,5—0,5°
Akbau 12.....	36—37°	?
B. 60	36—37°	3,5—0,5°
Java 201	35—36°	3,5—0,5°
Java 305	36—37°	6—8°
Harz 3.....	36—37°	6—8°

On le voit, les différences entre les températures maxima ne sont pas grandes. Il est étrange que la température minima de l'une des espèces de Java soit beaucoup plus basse que celle de l'autre, et plus basse aussi que celle de la levure Harz 3, espèce qui, comme le nom l'indique, provient d'une région montagneuse et froide.

Ainsi que je l'avais fait pour les neuf espèces souvent mentionnées, j'effectuai également, tout à fait de la même manière, des essais de chauffage avec les sept espèces dont traite ce chapitre. Ces essais ayant été effectués simultanément et dans un même moût, on pourra comparer les résultats des séries citées plus haut avec ceux qui vont suivre.

1ère Série.

	Chauffées pendant une demi-heure à			
	42°	45°	48°	50°
P. H. 4—2	+	+	÷	÷
Alpes Autr.	+	+	÷	÷
Akbau 12	+	+	+	+
B. 60.....	+	+	+	÷
Java 201	+	+	÷	÷
Java 305	+	+	÷	÷
Harz 3	+	+	÷	+

Ainsi donc, les sept espèces supportèrent toutes un chauffage d'une demi-heure à 45°; seules, Akbau 12 et B. 60 supportèrent 48°, et Akbau 12 put même supporter 50°. Il est étrange que Harz 3, qui n'avait pas supporté la température de 48°, ait supporté celle de 50°. Du reste, comme on le verra par la suite, cette espèce a encore montré une autre anomalie.

Cet essai fut répété et donna alors les résultats que voici:

2ème Série.

	Chauffées pendant une demi-heure à			
	42°	45°	48°	50°
P. H. 4—2	+	+	÷	
Alpes Autr.	+	+	+	
Akbau 12	+	+	+	+
B. 60.....	+	+	+	÷
Java 201	+	+	÷	
Java 305	+	+	÷	
Harz 3	+	+	÷	÷

Cette fois-ci, la levure «Alpes Autrichiennes» supporta la température de 48°, mais Harz 3 n'y survécut pas, pas plus d'ailleurs qu'à celle de 50°, température qu'elle avait supportée dans l'essai précédent. B. 60 ne supporta pas cette fois 50°. Comme je l'ai déjà dit, ces anomalies tenaient certainement à la nature de la levure de dépôt.

Ces sept espèces furent également essayées après une heure de chauffage. Les résultats obtenus sont consignés dans les deux tableaux qui suivent.

3ème Série.

	Chauffées pendant une heure aux temp. de			
	42°	45°	48°	50°
P. H. 4—2	+	+	÷	÷
Alpes Autr.	+	+	÷	÷
Akbau 12	+	+	+	+
B. 60.	+	+	+	÷
Java 201	+	+	÷	÷
Java 305	+	+	÷	÷
Harz 3	+	+	÷	÷

4ème Série.

	Chauffées pendant une heure aux temp. de		
	45°	48°	50°
P. H. 4—2	+	÷	÷
Alpes Autr.	+	+	÷
Akbau 12	+	+	+
B. 60.	+	+	÷
Java 201	÷	÷	÷
Java 305	÷	÷	÷
Harz 3	÷	÷	÷

Alors qu'ainsi dans la troisième série d'essais les sept espèces supportèrent toutes le chauffage d'une heure à 42 et 45°, il n'en fut pas de même dans la quatrième série, dans laquelle Java 201, Java 305 et Harz 3 avaient péri à 45°. Alpes Autr. ne supporta pas la température de 48° la première fois, et la supporta la seconde. Deux espèces se montrèrent constantes: Akbau 12 qui supporta les deux fois 50°, et B. 60 qui ne supporta les deux fois que 48°.

En comparant entre eux les résultats que nous venons d'exposer avec ceux donnés précédemment pour les neuf autres espèces, on remarquera que Akbau 12 (espèce qui provient de l'Algérie) est de beaucoup plus résistante à la chaleur que ne le sont les espèces provenant des régions tropicales.

Il ne me reste plus qu'à mentionner la forme que prennent les cellules dans du moût à haute température. Pour ces sept espèces, les essais ont été effectués à 33°; les figures reproduites sur les planches ci-jointes, permettront de se rendre facilement compte des transformations singulières qui ont lieu. Ce sont B. 60 et Harz 3 qui montrent les plus remarquables. Chez B. 60, à 25°,

les cellules affectent la forme régulière de citron, la longueur en étant comprise entre 4 et 6 μ (v. Planche III, Fig. 7); à 33°, ces cellules, au bout de trois jours, ont grossi et pris la forme de boudin, elles peuvent atteindre jusqu'à 14 et 16 μ (v. Planche III, Fig. 8). Quant à Harz 3, à 25°, ses cellules sont aussi en forme de citron (v. Planche IV, Fig. 13); mais à 33°, elles se sont allongées et forment de minces boudins (v. Planche IV, Fig. 14). P. H. 4—2, Alpes Autr., Akbau 12 et Java 201, montrent cette même tendance, bien qu'à un moindre degré. Java 305 ne subit pour ainsi dire aucun changement.

B. **Classification.**

L'espèce Saccharomyces apiculatus a été établie par Reess *[1870 N° 1]*. Il en donne la diagnose suivante: «Cellules bourgeonnantes, en forme de citron, dont les deux pôles sont munis de pointes courtes ayant en moyenne une largeur de 2—3 μ et une longueur de 6—8 μ; les cellules ont parfois la forme d'un court fil. Les nouveaux bourgeons se forment seulement aux pointes des cellules-mères, et le plus souvent, ils s'en détachent immédiatement; elles ne restent que rarement réunies en colonies, à peine ramifiées, de cellules peu nombreuses. La formation d'ascopores n'étant pas établie avec certitude, il paraît douteux que cette espèce appartienne au genre Saccharomyces».

Reess a trouvé le S. apic. dans du moût de raisin, dans du jus de fruits et dans de la bière belge (Faro) produite par fermentation spontanée.

Il dit en outre de cette levure, qu'au centre de la cellule se trouve presque toujours une grande vacuole, ronde ou elliptique. Les cellules-filles croissent jusqu'à ce qu'elles ont presque atteint la grosseur des cellules-mères, après quoi elles se tournent de côté, de manière que leur axe longitudinal arrive à être à angle droit avec celui de la cellule-mère. Après qu'elles se sont détachées, les cellules-filles elliptiques, n'ayant pas encore de pointes, montrent une certaine ressemblance avec le Sacch. ellipsoïdeus. Elles ne tardent cependant pas à prendre la forme de citron. Quelquefois, surtout vers la fin de la fermentation, les cellules s'allongent en forme de fuseaux ou de courts fils. Sur les milieux où d'autres espèces de Saccharomyces forment des spores, il ne s'en forme pas chez le S. apic.; mais,

dans ces conditions-là, les cellules prennent parfois des formes singulieres. Il peut arriver que le plasma d'une cellule se resserre au point de former au centre de la cellule une boule ayant la forme et l'apparence d'une spore; mais Reess n'a pu réussir à observer ni membrane, ni phénomènes de germination; les cellules ne purent également pas être amenées à former un mycélium. Dans des milieux nutritifs fermentescibles, cette espèce provoque des phénomènes de fermentation basse.

A la fin de sa description, Reess donne à cette espèce le nom de Sacch. citronatus. Il aura probablement changé ce nom qu'il lui avait donné d'abord, en corrigeant les épreuves de son mémoire, puis il aura oublié de faire aussi ce changement à cet endroit-là.

Les figures 9 à 12 de la Planche III jointe à son mémoire, représentent le S. apic.

Ainsi, bien que Reess n'ait pas trouvé de spores chez cette espece, il ne l'en rapporte pas moins au genre Saccharomyces, pour lequel il cite expressément comme étant un de ses caractères, le pouvoir de former des endospores.

Dans ses recherches, Cienkowski *[1872* N° *2]* arrive à ce résultat que le S. apic. n'est qu'une forme du développement du Mycoderma vini. Selon lui, il en serait de même pour plusieurs autres espèces de Saccharomyces établies par Reess.

Engel *[1872* N° *3]*, ainsi que je l'ai déjà dit, croit avoir découvert une nouvelle forme de fructification chez le S. apic, et il établit pour cette espèce un nouveau genre, le Carpozyma, dont il fait la caractéristique suivante: Les cellules végétatives ont la forme de citron, leurs pôles ont de courtes pointes; les nouveaux bourgeons se forment aux pointes de la cellule-mère. Les cellules-filles sont d'abord sphériques, plus tard elles deviennent ovales, et leur axe longitudinal forme alors un angle droit avec celui de la cellule-mère, après quoi les cellules-filles s'en détachent. Fructification: Il se forme d'abord un petit îlot de protoplasma dans le voisinage d'une des pointes, l'accumulation de protoplasma augmente, celui-ci s'arrondit et vient se placer au centre de la cellule, où il s'entoure ensuite d'une membrane. Au fur et à mesure que cette cellule-fille croît, la membrane de la cellule-mère s'épaissit, cette dernière perd ses pointes et s'arrondit. La membrane extérieure se détache à plusieurs endroits et, dans la cellule intérieure, il se forme des quantités de petites

spores Cette évolution se fait très lentement (dans le courant de trois à quatre mois).

Plus tard *[1872 N° 4]*, il donne le diagnostic générique suivant: «Thèques sphériques, revêtues d'une périthèque et hibernant. Spores nombreuses?» Les figures 18 et 19 de la planche jointe au mémoire en donnent une reproduction. On a toutefois reconnu plus tard que ces affirmations étaient inexactes.

Hansen *[1879 N° 6]* est d'avis que le S. apic. est identique avec le Sacch. Reessii, décrit par Blankenhorn, Moritz et David. En cela, il fait cependant erreur, car G. David *[1874 N° 5]*, dans la description qu'il fait de cette espèce, cite la figure 13 de Reess (et non pas la fig. 12 comme Hansen l'a dit), et Reess ne rapporte pas cette figure 13 au S. apic., mais il l'appelle une «levure de vin rouge», sans autre dénomination.

Amthor *[1888 N° 12]* est le premier qui ait avancé qu'il doit exister plusieurs races de S. apic. A l'appui de cette affirmation, il cite le fait qu'il a eu devant lui deux végétations donnant dans un même liquide nutritif des proportions d'alcool différentes. Wortmann *[1895 N° 31]* déclare aussi que le S. apic. comprend toute une série d'espèces différentes, et Behrens *[1896 N° 33]* qualifie de «Sammelname» l'appellation de S. apic.

Will *[1896 N° 36]* divise les formes du S. apic. en deux groupes, suivant que, dans du moût, elles développent un bouquet fortement accusé qui rappelle l'éther amylique, ou bien, une odeur particulière de moisi.

Lindner *[1895 N° 28]* a établi une variété du S. apic. qui vit dans une espèce de cochenille, sous le nom de S. apic. var. parasiticus, et Raciborski *[1898 N° 37]*[1]) mentionne une forme qui, à Java, fait périr les jeunes cannes à sucre. Il l'appelle S. apic. var. sacchari.

Après que Beijerinck *[1894 N° 23]* eut découvert des spores chez une forme du S. apic., Lindner *[1904 N° 47]* signale que lui aussi en avait trouvé une ayant des corpuscules ressemblant à des spores. C'est pourquoi il propose d'établir le

[1]) Comme il m'etait impossible de me procurer le mémoire original, M. Brix, chef de fabrication à Modjokerto (Java), eut la bonté de m'en envoyer une traduction, pour laquelle ici encore, je lui exprime mes meilleurs remercîments.

genre Hansenia pour le S. apic. Le diagnostic qu'il en donne plus tard *[1905* N° *50]*, est ainsi formulé:

«Hansenia Lindner in Mikroskop. Betriebskontrolle, 1905, S. 434.

Cellules en forme de citron; bourgeons partant des pôles. Sporulation très rare. Germination des spores non encore observée.

Ce genre comprend plusieurs espèces qui n'ont pas encore été suffisamment délimitées et qui, jusqu'ici, ont été appelées Saccharomyces apiculatus. La formation de spores a d'abord été observée par Beijerinck, ensuite par Lindner».

Les figures 6 et 20 représentent ce genre; la figure 20 montre des formations ressemblant à des spores.

P. 31. «Il en existe un certain nombre d'espèces et de races».

Selon Will *[1909* N° *61]*, le genre Hansenia comprend les formes de S. apic. chez lesquelles la sporulation est chose connue; les autres, celles qui n'ont pas le pouvoir de former des spores, appartiennent aux Torulacées. Zikes *[1911* N° *65]* propose de diviser les formes du S. apic. en deux groupes: l'un, pour lequel il propose la dénomination de Hanseniaspora, comprendrait les formes douées du pouvoir de sporulation, l'autre, qu'on devrait appeler Hansenia, celles n'ayant pas ce pouvoir. La forme découverte par Lindner s'appellerait ainsi Hanseniaspora Lindneri, et le S. apic. ordinaire, selon qu'il se trouve dans le vin ou dans la bière, Hansenia vini et H. cerevisiæ. C'est donc tout le contraire de ce que propose Lindner.

Finalement, Guilliermond *[1912* N° *66]* donne le diagnostic suivant du genre Hansenia Lindner: «Cellules généralement munies à l'une ou aux deux extrémités d'un petit mamelon semblable à la pointe d'un citron. Asques à une seule ascospore». Comme espèces, Guilliermond mentionne la H. apiculata Lindner et le S. apic. Reess-Hansen.

Ainsi donc, par ce qui précède, on peut voir qu'il n'est pas peu de savants qui sont de l'avis que la levure que Reess a dénommée S. apic., comprend plusieurs espèces ou plusieurs races. Il ne faut pas perdre de vue que Reess n'avait pas fait de recherches physiologiques sur son S. apic. Hansen fut le premier à faire des recherches de ce genre, recherches qui lui permirent de découvrir chez cette levure certains caractères que Reess n'a pas mentionnés. C'est pourquoi on n'est pas obligé d'admettre que le S. apic. Reess soit à tout prendre identique

au S. apic. Hansen, étant donné que le S. apic. Reess comprend toutes les cellules de levure en forme de citron qui ne peuvent pas former d'endospores et dont le pouvoir de fermentation est faible, cellules auxquelles du reste convient la description de Reess.

Sachant, par contre, avec certitude que l'espèce Hansen peut faire fermenter le dextrose et le lévulose, mais pas le saccharose, ni le maltose, et Reess ne disant rien au sujet de la manière dont l'espèce qu'il décrit se comporte vis-à-vis des divers sucres, il se peut que son espèce ait été identique à celle de Hansen, mais ce n'est pas absolument sûr.

Supposant que, seule, l'espèce étudiée par lui-même[1]) pouvait être désignée par l'appellation S. apic. Reess, Hansen choisit cette espèce pour en faire le sujet de ses recherches sur la circulation des levures dans la nature, pour le motif que, toujours, il pouvait la reconnaître, rien qu'en l'observant au microscope. Il ne peut guère y avoir de doute que, réellement, Hansen n'ait toujours eu la même forme devant lui, celle qui, dans ce qui va suivre, portera la dénomination de Pseudosaccharomyces apiculatus; toutes les autres espèces décrites dans ce mémoire ont été trouvées en d'autres endroits.

Comme aucune de ces espèces ne forme d'endospores, elles doivent nécessairement être rapportées à la famille des Torulaceæ, et, comme aussi, dans une jeune culture, toutes ces levures renferment en grand nombre des cellules ayant la forme de citron, je proposerais de les grouper en un genre auquel on donnerait le nom de Pseudosaccharomyces[2]).

Fam. Torulaceæ.

Pseudosaccharomyces n. gen.

Une grande partie des cellules des jeunes végétations sont en forme de citron. Le type en est le Sacch. apiculatus Reess.

---

[1]) Dans une note posthume de Hansen, on a pu voir que, plus tard, après que le S. apic. avait été trouvé en abondance dans de la terre des tropiques, Hansen s'était demandé s'il n'y en aurait quand même pas plusieurs espèces.

[2]) Van Laer *[1893* N° *21]* a employé l'appellation de «Pseudosaccharomyces» pour désigner le S. apic., mais pas précisément comme dénomination générique.

Les descriptions des espèces qu'on va lire mentionnent leur manière de se comporter vis-à-vis des sucres suivants: le dextrose, le lévulose, le saccharose, le maltose, le d-mannose, le lactose et le d-galactose. Aucune d'elles ne fait fermenter ces deux derniers sucres.

Aperçu des caractères des espèces ci-après décrites.

1. Les cellules ne contiennent pas d'invertine..... 2.
   Les cellules renferment de l'invertine ..... 8.

2. L'espèce peut faire fermenter de minimes quantités de maltose ..... 3.
   Ne peut pas faire fermenter le maltose..... 4.

3. Supporte un séjour d'une heure dans du moût à 50°. Dans du moût, la levure de dépôt est pulvérulente.....
   3. Ps. africanus.
   Ne supporte pas le séjour d'une heure dans du moût à 50°, mais le supporte, par contre, à 48°. Dans du moût, la levure de dépôt forme une plaque compacte .....
   4. Ps. corticis.

4. Forme au bout de cinq semaines, dans de l'eau de levure à 20 pour cent de dextrose, 3,5 à 3,7 pour cent d'alcool en volume..... 5.
   Forme dans les mêmes conditions 4,5 à 5,5 pour cent d'alcool en volume ..... 6.

5. Température minima pour le bourgeonnement dans du moût, 8—6° ..... 7. Ps. germanicus.
   Le minimum est de 3,5—0,5° ..... 5. Ps. Mülleri.

6. Température minima pour le bourgeonnement dans du moût, 8—6°..... 6. Ps. Lindneri.
   Le minimum est de 3,5—0,5° ..... 7.

7. Dans du moût à 25°, la longueur des cellules est tout au plus de 6 μ..... 2. Ps. austriacus.
   Dans du moût à 25°, la longueur des cellules va jusqu'à 10 μ..... 1. Ps. apiculatus.

8. Dans de l'eau de levure à 10 pour cent de saccharose, il ne se forme au bout de six semaines qu'une trace d'alcool..... 15. Ps. santacruzensis.
   Dans ces mêmes conditions, il se forme pour le moins 1,5 pour cent d'alcool en volume ..... 9.

9 L'alcool formé est tout au plus de 2 pour cent en volume. 10.
Forme plus de 3 pour cent d'alcool en volume..... 11.

10. Température maxima pour le bourgeonnement dans le moût, 36—37°; minimum 8—6°..... 10. Ps. malaianus.
Maximum 37—38°; minimum 4—3°.... 16. Ps. indicus.

11. Température maxima pour le bourgeonnement dans le moût, 39—40°..... 14. Ps. occidentalis.
Maximum au-dessous..... 12.

12. Dans le moût, la levure de dépôt forme des plaques compactes..... 13. Ps. antillarum.
La levure de dépôt est pulvérulente ou en grumeaux .. 13.

13. Supporte un chauffage d'une heure dans du moût à 45° ... 9. Ps. javanicus.
Ne supporte pas 45°..... 14.

14. Dans du moût à 35°, au bout de trois jours, les cellules, fortement gonflées, sont pyriformes ou ovoïdes; elles peuvent atteindre une longueur de 12 μ et une largeur de 6 μ..... 12. Ps. Willi.
Les cellules ne se présentent pas ainsi..... 15.

15. Dans du moût à 25°, les cellules sont très petites, longues tout au plus de 5 μ..... 8. Ps. Jenseni.
A 25°, les cellules sont longues et étroites; leur longueur va jusqu'à 10 μ..... 11. Ps. Lafari.

Espèces ne renfermant pas d'invertine.

1. **Ps. apiculatus** (Reess-Hansen) [= P. H. 4—2].

(Syn. Sacch. apiculatus Reess-Hansen).

Pl. II, Fig. 1 et 2.

Forme cellulaire. Dans la jeune végétation d'une culture faite dans du moût à 25°, on trouve aussi bien des cellules en forme de citron que des cellules ellipsoïdes; la longueur en est de 5 à 10 μ. Au repos, on voit se former en grand nombre des cellules longues et minces. Dans du moût à 33°, au bout de trois jours, les cellules sont gonflées et un grand nombre ont la forme de longs boudins.

Limites de température pour le bourgeonnement dans le moût: Maximum 36—37°; minimum 3,5—0,5°.

La levure de dépôt est en général peu consistante, se pulvérise et trouble le liquide quand on l'agite.

Limite de résistance au chauffage. Supporte un chauffage d'une heure dans le moût à 45°, mais ne le supporte pas à 48°.

Fermentation. Fait fermenter le dextrose, le lévulose et le d-mannose. Peut, au bout d'environ cinq semaines, former dans de l'eau de levure à 20 pour cent de dextrose, 5,52 pour cent d'alcool en volume.

Les colonies géantes sur le moût gélatiné, le liquéfient.

Habitat. La terre de vergers aux environs de Carlsberg.

Cette forme, ainsi que du reste la plupart des espèces ci-après décrites, correspond à la description que Reess a faite du S. apic. Je lui ai laissé son ancien nom spécifique pour le motif que c'est sur cette forme que Hansen a effectué ses recherches si étendues sur la circulation dans la nature de cette levure, et que c'est celle dont il a étudié si à fond la morphologie et la physiologie.

2. **Ps. austriacus** n. sp. [= Alpes Autr.].

Pl. II, Fig. 3 et 4.

Forme cellulaire. Dans la jeune végétation d'une culture faite dans du moût à 25°, on trouve aussi bien des cellules en forme de citron que des cellules ellipsoïdes, et, exceptionnellement, quelques rares cellules ayant la forme de boudin. La longueur des cellules est de 4 à 6 μ. Dans du moût à 33°, au bout de trois jours, on y voit principalement des cellules en forme de boudin, longues et minces; on n'y remarque pas de cellules particulièrement gonflées.

Limites de température pour le bourgeonnement dans le moût: Maximum 35—36°; minimum 3°,5—0°,5.

La levure de dépôt n'est en général pas consistante, et se pulvérise quand on secoue le ballon.

Limite de résistance au chauffage. Supporte parfois le séjour d'une heure dans le moût à 48°. La limite de température est donc dans ces environs.

Fermentation. Fait fermenter le dextrose, le lévulose et le d-mannose. Elle peut, au bout de cinq semaines environ, former dans l'eau de levure à 20 pour cent de dextrose, 4,75 pour cent d'alcool en volume.

Les colonies géantes sur du moût gélatiné, le liquéfient.

Habitat: Dans de la terre des Alpes Autrichiennes.

3. **Ps. africanus** n. sp. [= Akbau 12].

Pl. II, Fig. 5 et 6.

Forme cellulaire: Dans la jeune végétation d'une culture faite dans du moût à 25°, la plus grande partie des cellules sont en forme de citron allongé d'une longueur de 7 à 12 μ. Dans du moût à 33°, au bout de trois jours, la plupart des cellules prennent la forme de boudins assez gros.

Limites de température pour le bourgeonnement dans le moût: Maximum 36—37°; minimum ?

La levure de dépôt n'est, en général, pas consistante dans le moût, et se pulvérise quand on l'agite, tandis que dans l'eau de levure au dextrose, elle forme une plaque compacte.

Limite de résistance au chauffage. Supporte le séjour d'une heure dans le moût à 50°, mais pas à 52°.

Fermentation. Fait fermenter le dextrose, le lévulose, le d-mannose, et de très petites quantités de maltose. Peut former au bout de cinq semaines environ, dans l'eau de levure à 20 pour cent de dextrose, 8,76 pour cent d'alcool en volume.

Les colonies géantes sur le moût gélatiné, le liquéfient.

Habitat: Dans de la terre d'Akbau en Algérie.

4. **Ps. corticis** n. sp. [= B. 60].

Pl. III, Fig. 7 et 8.

Forme cellulaire. Dans la jeune végétation d'une culture faite dans le moût à 25°, la plupart des cellules ont la forme de citron court; on y voit un certain nombre de cellules ellipsoïdes. Leur longueur va de 6 à 15 μ. Dans du moût à 33°, au bout de trois jours, les cellules sont très fortement gonflées, et le plus grand nombre a pris la forme de boudin; on en voit souvent qui ont une longueur d'environ 30 μ.

Limites de température pour le bourgeonnement dans le moût: Maximum 36—37°; minimum 3°,5—0°,5.

La levure de dépôt se forme en plaques et en grumeaux qui se maintiennent compacts, si bien que, même si on l'agite, le liquide garde sa limpidité.

Limite de résistance au chauffage. Supporte le séjour d'une heure dans le moût à 48°, mais pas à 50°.

Fermentation. Fait fermenter le dextrose, le lévulose, le d-mannose, et de très faibles quantités de maltose. Peut, au

bout d'environ cinq semaines, former dans l'eau de levure à 20 pour cent de dextrose, 8,45 pour cent d'alcool en volume.

Les colonies géantes sur le moût gélatiné, le liquéfient.

Habitat: L'écorce, le lichen et la mousse d'arbres des environs de Copenhague.

5. **Ps. Mülleri** n. sp. [= Java 201].

Pl. III, Fig. 9 et 10.

Forme cellulaire: Dans la jeune végétation d'une culture engendrée dans du moût à 25°, les cellules sont petites, en forme de citron ou ellipsoïdes; elles ont seulement 4 à 6 μ de longueur. Dans du moût à 33°, au bout de trois jours elles sont gonflées, irrégulières, et montrent une quantité de formes bizarres.

Limites de température pour le bourgeonnement dans le moût: Maximum 35—36°; minimum 3°,5—0°,5.

La levure de dépôt n'est pas consistante, et devient pulvérulente quand on agite le ballon.

Limite de résistance au chauffage. Supporte parfois le séjour d'une heure, parfois seulement une demi-heure, dans le moût à 45°.

Fermentation. Fait fermenter le dextrose, le lévulose et le d-mannose. Peut, au bout d'environ cinq semaines, former dans l'eau de levure à 20 pour cent de dextrose, 3,45 pour cent d'alcool en volume.

Les colonies géantes sur le moût gélatiné, le liquéfient fortement.

Habitat: Dans de la terre de l'île de Java.

Je me suis permis de dénommer cette espèce d'après M. le Professeur et Dr Müller-Thurgau, à Wädenswil (Suisse).

6. **Ps. Lindneri** n. sp. [= Java 305].

Pl. III, Fig. 11 et 12.

Forme cellulaire. Dans la jeune végétation d'une culture engendrée dans du moût à 25°, les cellules sont petites, en forme de citron et ellipsoïdes; leur longueur n'est que de 3 à 5 μ. Dans du moût à 33°, au bout de trois jours, elles sont un peu plus grandes et plus allongées; on n'y voit pas de formes particulièrement bizarres.

Limites de température pour le bourgeonnement dans le moût: Maximum 36—37°; minimum 8—6°.

La levure de dépôt se forme généralement en grumeaux compacts.

Limite de résistance au chauffage. Supporte parfois le séjour d'une heure, parfois seulement une demi-heure, dans le moût à 45°.

Fermentation. Fait fermenter le dextrose, le lévulose et le d-mannose. Peut, au bout d'environ cinq semaines, former dans l'eau de levure à 20 pour cent de dextrose, 5,41 pour cent d'alcool en volume.

Les colonies géantes sur le moût gélatiné, le liquéfient fortement.

Habitat: Dans de la terre de l'île de Java.

Je me suis permis de dénommer cette espèce d'après M. le Professeur et Dr Lindner, à Berlin.

7. **Ps. germanicus** n. sp. [= Harz 3].

Pl. IV, Fig. 13 et 14.

Forme cellulaire. Dans la jeune végétation d'une culture engendrée dans du moût à 25°, la majeure partie des cellules sont en forme de citron; un petit nombre seulement sont ellipsoïdes. Leur longueur est de 5 à 8 μ. Dans du moût à 33°. au bout de trois jours, les cellules sont très gonflées, et la plupart ont la forme de longs boudins; un grand nombre ont jusqu'à 30 μ de longueur.

Limites de température pour le bourgeonnement dans le moût: Maximum 36—37°; minimum 8—6°.

La levure de dépôt n'est pas consistante, et se pulvérise quand on agite le ballon.

Limites de résistance au chauffage. Supporte parfois le séjour d'une heure dans du moût à 45°, parfois pas; le supporte toujours, par contre, à 42°.

Fermentation. Fait fermenter le dextrose, le lévulose et le d-mannose. Peut, au bout d'environ cinq semaines, former dans l'eau de levure à 20 pour cent de dextrose, 3,72 pour cent d'alcool en volume.

Les colonies géantes sur le moût gélatiné, le liquéfient.

Habitat: Dans de la terre du Harz.

Espèces contenant de l'invertine.

8. **Ps. Jenseni** n. sp. [= Java 403].

Pl. IV, Fig. 15 et 16.

Forme cellulaire. Dans la jeune végétation d'une culture engendrée dans du moût à 25°, un grand nombre des cellules ont la forme ellipsoïde, et relativement peu celle de citron; elles sont très petites, leur longueur n'étant que de 2 à 5 μ. Dans du moût à 35°, au bout de trois jours, les cellules sont plus grosses; mais, au fond, elles ont gardé les mêmes formes.

Limites de température pour le bourgeonnement dans le moût: Maximum 37—38°; minimum 6°—3°,5.

La levure de dépôt n'est pas consistante, et se pulvérise quand on agite le ballon.

Limite de résistance au chauffage. Supporte le séjour d'une heure dans le moût à 42°, mais pas à 45°.

Fermentation. Fait fermenter le dextrose, le lévulose, le d-mannose, le saccharose, et de très faibles quantités de maltose. Peut, au bout d'environ six semaines, former dans l'eau de levure à 10 pour cent de saccharose, 3,84 pour cent d'alcool en volume, et, dans l'eau de levure à 20 pour cent de dextrose, au bout de trois mois, 5,21 pour cent.

Les colonies géantes sur le moût gélatiné, le liquéfient.

Habitat: Dans de la terre de l'île de Java.

Je me suis permis de dénommer cette espèce d'après M. Hjalmar Jensen, lic.-ès-sc., actuellement à Buitenzorg, dans l'île de Java, à qui le Laboratoire de Carlsberg est redevable d'un certain nombre d'échantillons de terre.

9. **Ps. javanicus** n. sp. [= Java 104].

Pl. IV, Fig. 17 et 18.

Forme cellulaire. Dans la jeune végétation d'une culture engendrée dans du moût à 25°, presque toutes les cellules sont grandes et en forme de citron, quelques autres ont la forme d'un citron allongé, d'autres encore sont ellipsoïdes; leur longueur varie de 6 à 12 μ. Dans du moût à 35°, au bout de trois jours, les cellules ont pour ainsi dire les mêmes formes qu'à 25°, peut-être sont-elles légèrement plus grandes.

Limites de température pour le bourgeonnement dans le moût: Maximum 38—39°; minimum 8—6°.

La levure de dépôt est peu consistante; elle se pulvérise quand on agite le ballon.

Limite de résistance au chauffage. Supporte le séjour d'une heure dans le moût à 45°, mais pas à 48°.

Fermentation. Fait fermenter le dextrose, le lévulose, le d-mannose, le saccharose, et de très faibles quantités de maltose. Peut, au bout d'environ six semaines, former dans l'eau de levure à 10 pour cent de saccharose, 3,84 pour cent d'alcool en volume, et, dans l'eau de levure à 20 pour cent de dextrose, au bout de trois mois, 4,94 pour cent.

Les colonies géantes sur le moût gélatiné, le liquéfient.

Habitat: Dans de la terre de l'île de Java.

10. **Ps. malaianus** n. sp. [= Java 104 a].

Pl. V, Fig. 19 et 20.

Forme cellulaire. Dans la jeune végétation d'une culture engendrée dans du moût à 25°, les cellules ont la forme de citrons allongés et de boudins courts; leur longueur est de 5 à 12 μ. Dans du moût à 35°, au bout de trois jours, les cellules se sont élargies, et beaucoup sont devenues presque sphériques; elles ont l'air très affaiblies.

Limites de température pour le bourgeonnement dans le moût: Maximum 36—37°; minimum 8—6°.

La levure de dépôt n'a pas de consistance; elle se pulvérise quand on agite le ballon.

Limite de résistance au chauffage. Supporte le séjour d'une heure dans le moût à 42°, mais pas à 45°.

Fermentation. Fait fermenter le dextrose, le lévulose, le d-mannose, le saccharose, et de très faibles quantités de maltose. Peut, au bout d'environ six semaines, former dans l'eau de levure à 10 pour cent de saccharose, 1,92 pour cent d'alcool en volume et, au bout de trois mois, dans l'eau de levure à 20 pour cent de dextrose, 3,07 pour cent.

Les colonies géantes sur le moût gélatiné, ne le liquéfient pas.

Habitat: Dans de la terre de l'île de Java.

11. **Ps. Lafari** n. sp. [= Java 105].

Pl. V, Fig. 21 et 22.

Forme cellulaire. Dans la jeune végétation d'une culture engendrée dans du moût à 25°, la plupart des cellules ont la forme de citron allongé, quelques autres sont ellipsoïdes allongées; leur longueur est de 5 à 10 μ. Dans du moût à 35°, au bout de trois jours, les cellules sont beaucoup plus larges et plus grandes qu'à 25°; plusieurs ont gardé la forme de citron, mais beaucoup sont en forme de boudins courts, très peu seulement se sont allongées.

Les limites de température pour le bourgeonnement dans le moût: Maximum 36—37°; minimum 8—6°.

La levure de dépôt se forme généralement en grumeaux.

Limite de résistance au chauffage. Supporte le séjour d'une heure dans le moût à 42°, mais pas à 45°.

Fermentation. Fait fermenter le dextrose, le lévulose, le d-mannose, le saccharose, et de très faibles quantités de maltose. Peut, au bout d'environ six semaines, former dans l'eau de levure à 10 pour cent de saccharose, 3,48 pour cent d'alcool en volume et, dans l'eau de levure à 20 pour cent de dextrose, au bout de trois mois, 4,53 pour cent.

Les colonies géantes sur le moût gélatiné, le liquéfient.

Habitat: Dans de la terre de l'île de Java.

Je me suis permis de dénommer cette espèce d'après mon vieil ami, M. le Professeur et Dr Fr. Lafar, à Vienne en Autriche.

12. **Ps. Willi** n. sp. [= St Thomas 103].

Pl. V, Fig. 23 et 24.

Forme cellulaire. Dans la jeune végétation d'une culture engendrée dans du moût à 25°, les cellules ont la forme de citron, quelques-unes seulement sont petites et de forme ellipsoïde; leur longueur varie entre 4 et 10 μ. Dans du moût à 35°, au bout de trois jours, les cellules sont, pour la plupart, fortement gonflées, pyriformes ou oviformes; quelques-unes ont une longueur de 12 μ, et une largeur de 6 μ.

Limites de temperature pour le bourgeonnement dans le moût: Maximum 37°,5—38°,5; minimum 8—6°.

La levure de dépôt n'a pas de consistance, et se pulvérise quand on agite le ballon.

Limite de résistance au chauffage. Supporte le séjour d'une heure dans le moût à 42°, mais pas à 45°.

Fermentation. Fait fermenter le dextrose, le lévulose, le d-mannose, le saccharose, et de très faibles quantités de maltose. Peut, au bout d'environ six semaines, former dans l'eau de levure à 10 pour cent de saccharose, 4,6 pour cent d'alcool en volume et, dans l'eau de levure à 20 pour cent de dextrose, au bout de trois mois, 5 pour cent.

Les colonies géantes sur le moût gélatiné, le liquéfient.

Habitat: Dans de la terre de St Thomas.

Je me suis permis de dénommer cette espèce d'après M. le Professeur et Dr H. Will, à Munich.

13. **Ps. antillarum** n. sp. [= St Thomas 208].

Pl. VI, Fig. 25 et 26.

Forme cellulaire. Dans la jeune végétation d'une culture engendrée dans du moût à 25°, les cellules sont en forme de citron, quelques rares exceptions sont petites et ellipsoïdes; leur longueur est de 5 à 12 μ. Dans du moût à 35°, au bout de trois jours, les cellules sont à peine plus grosses et on en voit davantage ayant la forme ellipsoïde.

Les limites de température pour le bourgeonnement dans le moût: Maximum 37—38°; minimum 4—3°.

La levure de dépôt se forme dans le moût en plaques compactes; mais, dans l'eau de levure additionnée de dextrose, elle n'est pas consistante, et se pulvérise quand on agite le ballon.

Limite de résistance au chauffage. Supporte le séjour d'une heure dans le moût à 42°, mais pas toujours à 45°.

Fermentation. Fait fermenter le dextrose, le lévulose, le d-mannose, le saccharose, et de très faibles quantités de maltose. Peut, au bout d'environ six semaines, former dans l'eau de levure à 10 pour cent de saccharose, 4,35 pour cent d'alcool en volume et, dans l'eau de levure à 20 pour cent de dextrose, au bout de trois mois, 5,27 pour cent.

Les colonies géantes sur le moût gélatiné, le liquéfient.

Habitat: Dans de la terre de St Thomas.

14. **Ps. occidentalis** n. sp. [= Ste Croix i].

Pl. VI, Fig. 27 et 28.

Forme cellulaire. Dans la jeune végétation d'une culture engendrée dans du moût à 25°, les cellules ont principalement la forme typique de citron, et sont passablement épaisses; on en voit pas mal d'ellipsoïdes; leur longueur est de 6 à 10 μ. Dans du moût à 35°, au bout de trois jours, les cellules sont beaucoup plus grosses, et la forme de citron disparaît chez un grand nombre.

Limites de température pour le bourgeonnement dans le moût: Maximum 39—40°; minimum 6—3°,5.

La levure de dépôt se forme dans le moût en plaques compactes; mais, dans l'eau de levure, elle n'a pas de consistance, et se pulvérise quand on agite le ballon.

Limite de résistance au chauffage. Supporte le séjour d'une heure dans le moût à 45°, mais pas à 48°.

Fermentation. Fait fermenter le dextrose, le lévulose, le d-mannose, le saccharose, et de très faibles quantités de maltose. Peut, au bout d'environ six semaines, former dans l'eau de levure à 10 pour cent de saccharose, 3,11 pour cent d'alcool en volume et, dans l'eau de levure à 20 pour cent de dextrose, au bout de trois mois, 5,54 pour cent.

Les colonies géantes sur le moût gélatiné, le liquéfient.

Habitat: Dans de la terre de Ste Croix.

15. **Ps. santacruzensis** n. sp. [= Ste Croix 409].

Pl. VI, Fig. 29 et 30.

Forme cellulaire. Dans la jeune végétation d'une culture engendrée dans du moût à 25°, les cellules ont pour la plupart la forme typique de citron, mais beaucoup sont ellipsoïdes, et, toutes, pour ainsi dire, ont de grosses vacuoles. Leur longueur est de 6 à 10 μ. Dans du moût à 35°, au bout de trois jours, les cellules prennent un aspect bizarre, du fait qu'elles se sont transformées en boudins très gros et très longs, allant jusqu'à 40 μ de longueur et 4 μ d'épaisseur.

Limites de température pour le bourgeonnement dans le moût: Maximum 37—38°; minimum 6—3°,5.

La levure de dépôt n'a pas de consistance dans le moût, et se pulvérise quand on agite le ballon; dans l'eau de levure au dextrose, par contre. elle se forme en masses compactes.

Limite de résistance au chauffage. Supporte le séjour d'une heure dans le moût à 42°, parfois aussi à 45°.

Fermentation. Fait fermenter le dextrose, le lévulose, le d-mannose, et de très faibles quantités de saccharose et de maltose. Dans l'eau de levure à 10 pour cent de saccharose, elle ne forme qu'une trace d'alcool, même après un repos de six semaines; par contre, dans l'eau de levure à 20 pour cent de dextrose, elle peut, au bout de trois mois, avoir formé 8,2 pour cent d'alcool en volume.

Les colonies géantes sur le moût gélatiné, le liquéfient.

Habitat: Dans de la terre de Ste Croix.

16. **Ps. indicus** n. sp. [= Himalaya 1].

Pl. VII, Fig. 31 et 32.

Forme cellulaire. Dans la jeune végétation d'une culture engendrée dans du moût à 25°, les cellules sont tant en forme de citron, qu'ellipsoïdes ou en forme de boudins courts; leur longueur va de 3 à 7 μ. Dans du moût à 35°, au bout de trois jours, une partie d'entre elles sont devenues un peu plus grandes et surtout plus épaisses; on ne voit que quelques rares cellules géantes de formes bizarres.

Limites de température pour le bourgeonnement dans le moût: Maximum 37—38°; minimum 4—3°.

La levure de dépôt n'a pas de consistance, et se pulvérise quand on agite le ballon.

Limite de résistance au chauffage. Supporte le séjour d'une heure dans le moût à 42°, mais pas à 45°.

Fermentation. Fait fermenter le dextrose, le lévulose, le d-mannose, le saccharose, et de très faibles quantités de maltose. Peut, au bout d'environ six semaines, former dans l'eau de levure à 10 pour cent de saccharose, 1,51 pour cent d'alcool en volume, et, dans l'eau de levure à 20 pour cent de dextrose, au bout de trois mois, 5,35 pour cent.

Les colonies géantes sur le moût gélatiné, le liquéfient.

Habitat: Dans de la terre de l'Himalaya.

2. **Formes sporogènes.**

Beijerinck *[1894 N° 23]* est, à ma connaissance, le premier qui a trouvé des spores chez «le S. apic.» et en a donné une

communication authentique. Le Laboratoire de Carlsberg reçut de lui, sur de l'agar-agar pur, une culture renfermant des spores. Ces spores étaient demi-sphériques avec une tendance à former un filet saillant (la «forme de chapeau»). Aux cultures était jointe une photographie de quelques-unes des cellules avec leurs spores. Toutefois, au laboratoire, cette culture perdit vite le pouvoir de former des spores. Je ne pus arriver plus tard qu'une seule fois à lui en faire former, et encore n'y en eut-il que très peu.

Plus tard, Lindner *[1903* N° *45]* dit qu'il a trouvé chez le S. apic. des «corpuscules ayant de la ressemblance avec les spores». La reproduction qu'il en donne fait distinctement voir que la spore présumée est sphérique ou légèrement ellipsoïde, ce qui est absolument autre chose que ce qu'a trouvé Beijerinck. Lindner ne réussit pas à voir germer ces corpuscules. Röhling, par contre *[1905* N° *52]*, croyait y être arrivé. Il a annoncé que toutes les végétations de S. apic. qu'il a essayées ont donné au bout de dix jours sur des blocs de plâtre, une quantité de «formations ayant de la ressemblance avec les spores». Cependant, ces formations ne sont probablement pas des spores, mais sont plutôt les corpuscules graisseux déjà mentionnés par Reess *[1870* N° *1]* et plus tard par moi *[1895* N° *27]*. De ces spores présumées, Röhling ne croit en avoir vu germer qu'une seule, mais il n'en a malheureusement pas donné de dessin, pas plus de la «spore» que de la germination. Les investigateurs postérieurs à Röhling, Müller-Thurgau et Zikes, par ex., n'ont pas pu obtenir les «spores» en question, mais seulement ces corpuscules graisseux. C'est pourquoi nous inclinons à croire que le tout n'est certainement qu'une erreur.

Au Laboratoire de Carlsberg, on trouva, il y a une dizaine d'années, dans des échantillons de terre provenant d'un pré appelé «Vesterfælled» situé près de Valby, une forme de S. apic. qui, après avoir été ensemencée sur la surface de moût gélatiné, donna des spores en quantité abondante. Leur aspect extérieur correspondait entièrement à celui des spores photographiées de Beijerinck et de celles se trouvant dans la culture qu'il nous avait envoyée. On prit plus tard de nombreux échantillons de terre au même endroit, et on trouva cette forme de levure sporifère dans presque tous ces échantillons. Mais cependant, au cours de la culture au laboratoire, cette forme-là aussi, tout

comme la forme de Beijerinck, ne tarda pas à perdre le pouvoir de sporulation. En observant leur germination, j'ai pu constater, non pas une fois seulement, mais maintes fois, que, dans ces cas-là, c'était bien réellement des spores qui avaient été formées. Car, quand on a semé dans une chambre humide une culture de spores que l'on a d'abord fait sécher d'après la manière décrite plus loin, puis, pendant un certain temps, ramollir dans du moût, il est facile d'observer la germination.

Comme il se pouvait que le S. apic. trouvé dans les vergers de Valby n'ait été qu'une forme asporogène du S. apic. trouvé dans la terre de Vesterfælled, tous deux concordant d'une façon générale, j'entrepris des essais en nombre extraordinaire avec des S. apic. provenant de ces vergers, pour leur faire former des spores; mais de tous ces essais aucun ne donna de résultats positifs. Récemment encore, Zikes a éprouvé le même insuccès *[1911* N° *65]*.

Comme dernier essai, je semai le S. apic. de Vesterfælled dans de la terre des vergers, et le S. apic. des vergers de Valby dans de la terre de Vesterfælled. Ils y restèrent de six mois à un an à une basse température. Mon but, en faisant ces essais-là, était de rechercher si, peut-être, la nature de la terre exerçait une influence sur le pouvoir de sporulation, la terre des vergers contenant beaucoup plus de sucre que celle d'un pré comme Vesterfælled ou, en fait d'arbustes, il n'y a que des aubépines et des prunelliers. Et c'est ainsi que, après ce séjour dans la terre des vergers, je constatais que le S. apic. de Vesterfælled avait gardé, bien que légèrement affaibli, son pouvoir de sporulation — ce qui toutefois pouvait être dû à un hazard —, tandis que le S. apic. des vergers ne pouvait former de spores, même après avoir séjourné toute une année dans la terre de Vesterfælled.

Là-dessus, je renonçai à continuer ces essais, et je me mis alors à rechercher par quoi d'autre que leur pouvoir de sporulation, ces deux formes de S. apic. se différenciaient encore. Dans ce qui précède, j'ai décrit sous le nom de Pseudosaccharomyces apiculatus (Reess-Hansen), l'espèce provenant de la terre des vergers. Dans ce qui va suivre, on trouvera un exposé, comparatif sommaire entre cette forme-là et la forme sporogène qui nous occupe ici.

Quand on veut examiner une forme de S. apic. au point de vue de son pouvoir de sporulation, il faut l'isoler aussi rapide-

ment que possible du milieu dans lequel, ou sur lequel, on l'a trouvée dans la nature. N'ayant trouvé que dans la terre l'espèce sporogène, je l'ai isolée en plaçant la terre dans laquelle se trouvait l'espece dans du moût de bière additionné d'une faible dose d'acide tartrique, puis j'ai abandonné le tout à la température de 25°. Aussitôt qu'un développement de S. apic. se formait, la culture était disséminée sur la surface de moût gélatiné. Au bout de quelque temps de repos, dans les colonies qui se seront formées, on trouvera alors les spores si l'on est vraiment en présence de l'espèce sporogène. Celle-ci pourra alors aisément être isolée, et même après plusieurs cultures dans du moût, pour peu qu'on l'ait répandue sur du moût gélatiné, elle pourra encore produire des spores. Toutefois, un séjour prolongé dans le moût lui fera perdre peu à peu son pouvoir de sporulation. Plus tard, j'ai trouvé qu'il valait mieux employer du moût gélatiné additionné d'agar au lieu de moût gélatiné pur; conservée dans une solution de saccharose, après un séjour de deux ans dans cette solution, elle n'avait pas encore perdu son pouvoir de sporulation lorsqu'on la sema sur du moût gélatiné additionnée d'agar après un rafraîchissement préalable dans du moût.

Après avoir ensemencé dans de la bière double une végétation qui en apparence avait perdu son pouvoir sporogène, il s'y forma un faible voile dans lequel se trouvaient un grand nombre de spores. J'instituai alors de nombreux essais sur différentes végétations qui, auparavant déjà, avaient formé des spores et qui, au courant des années, étaient devenues asporogènes; je fis en outre ces mêmes essais sur un grand nombre d'autres formes de S. apic., mais, chose étrange, aucune n'arriva à former de voile sur la bière double, et il n'y eut également aucune formation de spores. Dans une seule culture, on put constater, après six mois de repos, un mince anneau de levure, et dans cet anneau se trouvaient de nouveau des spores en quantité.

Comme on pouvait penser que, dans le premier essai, à la suite du long abandon auquel la bière double avait été laissée, il s'était formé un voile composé de sécrétions de la bière, et que la levure ensemencée étant restée sur ce voile et partant, empêchée de tomber au fond, elle s'était développée sur ce même voile, on fit évaporer de la bière double jusqu'à ce qu'à la surface apparut un mince voile, sur lequel la levure fut alors semée. Mais aucun de ces essais ne donna le résultat

attendu. J'essayai aussi de semer la levure sur des blocs de plâtre placés dans de la bière double au lieu d'eau; mais là non plus, il ne se forma pas de spores. Quant à ce qui, dans un de ces cas, a pu amener l'espèce à former un voile sur la bière double, ce m'est une énigme. Mais, quoiqu'il en soit, ce fait montre en tout cas que, comme tel, le pouvoir de sporulation ne s'était pas perdu; il s'agit seulement de pouvoir trouver pour cette espèce les conditions de culture favorisant la formation des spores. Comme nous l'avons déjà mentionné plus haut, l'ensemencement sur du moût gélatiné additionné d'agar, semblerait être particulièrement favorable.

Quand on voudra conserver des végétations de manière à leur faire garder leur pouvoir de sporulation, on y arrivera en en faisant dessécher les végétations qui devront plus tard servir aux ensemencements. Ainsi que nous l'avons dit précédemment, on pourra aussi conserver une culture de spores à basse température dans de la terre stérilisée. Quant à la conservation dans une solution de saccharose, nous l'avons mentionnée plus haut.

La dessiccation peut se faire en prenant une partie de la végétation sporifère qui se trouve donc sur du moût gélatiné additionnée ou non d'agar, pour la déposer sur des petites boules de coton stérilisé ayant environ $^3/_4$ cm. de diamètre, puis on met celles-ci dans une fiole Erlenmeyer stérilisée, bouchée avec un tampon de ouate et qu'on place dans un exsiccateur à la température ordinaire du laboratoire. La dessiccation entièrement faite (au bout d'une dizaine de jours), on plonge dans de la gélatine pure fondue les petites boules de coton portant la levure desséchée, on les dépose dans une fiole stérilisée, bouchée avec un tampon de ouate, qu'on replace dans un exsiccateur, où il reste jusqu'à ce que les boules soient complètement séchées (environ dix jours), après quoi on les introduit dans des matras Freudenreich, qu'on cachette avec de la cire. Ces matras peuvent séjourner très longtemps dans les armoires à cultures sans que les végétations entourées de gélatine perdent la vie. En procédant ainsi à la conservation de végétations, j'ai pu en conserver intactes pendant trois ans environ. Lorsqu'on voudra avoir des spores fraîches pour faire des essais, on placera dans du moût une de ces boules portant la levure desséchée. Quand il s'y sera produit un développement, on sèmera une petite portion du mélange sur la surface d'un moût gélatiné additionné d'agar, et

on aura de nouveau une sporulation abondante. Ce sont surtout, ou même exclusivement, les spores qui se développent quand la boule de coton est mise dans du moût; aussi peut-on y observer la germination des spores, ainsi qu'elle est reproduite par les figures 40, 41 et 42 de la Planche VIII. J'ai ainsi observé la germination de milliers de spores. Celle de l'espèce qui nous occupe ici, a lieu de la même manière que chez la plupart des Saccharomycètes, c'est-à-dire que la spore se gonfle fortement et qu'elle pousse ensuite des bourgeons. Il ne se forme pas de promycélium.

En raison de la forme des spores, l'espèce que nous venons de décrire devra appartenir à un genre particulier se rapportant à la famille des Saccharomycetaceæ. Lindner *[1904 N° 47]* a proposé la dénomination de Hansenia pour la forme sporifère du S. apic., mais Zopf, en 1883[1]) déjà, a donné ce même nom à un genre de champignons dont le type est le Sordaria insignis Hansen. Zikes *[1911 N° 65]* qui croit que Lindner a appliqué le nom générique de Hansenia aux espèces asporogènes — ce qui cependant n'est pas exact, — a proposé de désigner la forme sporogène par le nom de Hanseniaspora. Je propose de lui maintenir cette dénomination malgré que Zikes n'en ait pas établi de diagnostic générique.

Fam. Saccharomycetaceæ.

Hanseniaspora Zikes.

Centralbl. f. Bakt. etc., 2. Abt., **30,** 145 (1911)

Syn. Hansenia, P. Lindner (pro parte).

Les cellules de la jeune végétation sont principalement en forme de citron. Les spores mûres sont demi-sphériques et munies d'un filet plus ou moins saillant, ce qui rend la forme de chapeau plus ou moins accusée. Elles germent par bourgeonnement (sans qu'il y ait eu formation préalable de promycélium).

[1]) Zopf, Zur Kenntnis der anatomischen Anpassung der Pilzfrüchte an die Funktion der Sporenbildung. (Zeitschr. f. Naturw., **56**, 539 (1883)).

H. valbyensis n. sp.

Pl. VII, Fig. 33—36 et Pl. VIII, Fig. 37—42.

Forme cellulaire. Dans la jeune végétation d'une culture engendrée dans du moût à 25°, les cellules sont soit en forme de citron, soit ellipsoïdes et allongées; toutefois on peut en voir quelques-unes ayant la forme de boudin court. Leur longueur est de 5 à 8 μ. Dans du moût à 30°, au bout de trois jours, on voit apparaître des cellules assez longues ayant la forme de boudin; mais du reste, on en voit encore qui ont la forme de citron, et des ellipsoïdes.

Limites de température pour le bourgeonnement dans le moût: Maximum 32—33°; le minimum est au-dessous de 0°,5.

La levure de dépôt ne se comporte pas toujours de la même manière; le plus souvent, elle se dépose sous la forme d'une plaque compacte et adhérente au fond du ballon.

Limite de résistance au chauffage. Les cellules végétatives supportent le séjour d'une heure dans le moût à 42°, mais pas à 45°.

Les spores à l'état jeune sont à peu près sphériques (v. Pl. VII, Fig. 35, et Pl. VIII, Fig. 37 et 39). Plus tard, elles deviennent demi-sphériques et leur base est entourée d'un filet saillant ayant environ 2 μ de diamètre (Pl. VII, Fig. 36, et Pl. VIII, Fig. 38). Une cellule, généralement, contient deux spores qui ont leurs bases tournées l'une contre l'autre et qui peu à peu, en croissant, viennent à se souder. On ne trouve que rarement une seule spore dans une cellule. Avant la germination, elle se gonfle, et le filet peut alors disparaître (Pl. VIII, Fig. 41 et 42).

Fermentation. Cette espèce fait fermenter le dextrose, le lévulose et le d-mannose. Dans de l'eau de levure à 10 pour cent de dextrose, elle peut, au bout de trois semaines environ, former 5,25 pour cent d'alcool en volume, et dans l'eau de levure à 20 pour cent de dextrose, au bout de cinq semaines environ, 6,75 pour cent. Dans le moût, elle avait formé au bout d'un mois 0,93 pour cent d'alcool en volume; mais au bout de trois mois, la proportion en était réduite à 0,3 pour cent.

Formation d'acide. Après un abandon de sept jours dans de l'eau de levure à 10 pour cent de dextrose, 10 cc. de ce li-

quide exigèrent pour la neutralisation, dans trois différents essais: 1,7 cc. d'hydroxyde de sodium $^{n}/_{10}$ pour le premier, 1,9 cc. pour le deuxième et 1,7 cc. pour le troisième.
Les colonies géantes sur le moût gélatiné, le liquéfient.
Habitat: Dans de la terre du Vesterfælled, Valby, Copenhague.

Dans ce qui précède, j'ai mentionné la possibilité que le Pseudosacch. apiculatus pouvait bien être la forme asporogène de l'espèce H. valbyensis. Les nombreux essais que j'ai effectués à l'effet de vérifier s'il en était bien ainsi, n'ayant pas confirmé cette supposition, tout en n'en établissant pas non plus le contraire, j'ai cherché, comme je l'ai déjà dit, à trouver chez ces deux formes d'autres différences que celle qui s'était manifestée dans le pouvoir de sporulation, et je suis parvenu à en constater. Le tableau ci-après fait voir réunis quelques-uns des caractères de ces deux espèces qui montrent des divergences.

Ps. apiculatus.	H. valbyensis.
Température maxima pour le bourgeonnement dans le moût:	
36—37 °	32—33 °.
Température minima pour le bourgeonnement dans le moût:	
3 °,5 — 0 °,5	au-dessous de 0 °,5
Forme au bout de 15 jours sur une décoction de pommes:	
Un voile.	N'en forme pas.
Forme au bout de 23 jours sur du jus de groseille à maquereau:	
Un voile dans lequel il y a des cellules très allongées.	Un voile très léger dans lequel les cellules ne sont pas allongées.
Forme au bout d'un mois sur du jus de prune:	
Un fort voile.	N'en forme pas.

La levure de dépôt dans le moût:	
est pulvérulente,	se forme en plaques
n'est pas compacte.	consistantes.
Peut, au bout de cinq semaines environ, former dans l'eau de levure à 20 pour cent de dextrose:	
5,52 pour cent d'alcool en volume.	6,75 pour cent d'alcool en volume.

De ce tableau, il ressort clairement qu'il s'agit bien ici de deux espèces différentes, ce qui est en outre établi par le fait que, chez le Ps. apic., la formation de voile est fortement prononcée. En effet, si le Ps. apic. était une forme asporogène du H. valbyensis, le pouvoir de formation de voile se serait sûrement perdu chez cette espèce en même temps que le pouvoir de sporulation. Du reste, Hansen a démontré qu'il en avait été ainsi pour toutes les variétés asporogènes de Saccharomycètes qu'il avait isolées.

Au cours des recherches que je viens d'exposer, M. M. H. de Fine Olivarius et V. Topp, mes aides au Laboratoire, m'ont prêté un précieux concours, pour lequel, ici encore, je leur exprime mes meilleurs remercîments, ainsi que pour les photographies qui sont reproduites sur les planches jointes à ce mémoire et dont je suis redevable à M. Topp.

Juillet 1913.

Liste bibliographique.

1. Reess, M., Botanische Untersuchungen über die Alkoholgährungspilze. Leipzig 1870.

2. Cienkowski, L., Die Pilze der Kahmhaut. (Bull. de l'Acad. Impér. de St. Pétersbourg. **17,** 566 (1872)).

3. Engel, L., Étude morphologique des diverses espèces de levûres alcooliques. (Compt. rend. de l'Acad. **74,** 468 (1872)).

4. Engel, L., Les ferments alcooliques. Études morphologiques. Paris 1872.

5. David, Georg, Ueber Rothweingährungspilze. (Annalen der Oenologie, **4,** 223 (1874)).

6. Hansen, Emil Chr., Organismer i Øl og Ølurt. Botaniske Undersøgelser. Kjøbenhavn 1879.

7. Hansen, Emil Chr., Ueber Saccharomyces apiculatus. (Hedwigia, 1880, p. 75).

8. Hansen, Emil Chr., Sur le Saccharomyces apiculatus et sa circulation dans la nature. (Compt. rend. Laborat. Carlsb., **1,** 159 (1881)).

9. Boutroux, L., Deuxième note sur les ferments alcooliques. (Bull. de la Soc. Linn. de Normandie, [3], **7,** 1883).

10. Hansen, Emil Chr., Les ascospores chez le genre Saccharomyces. (Compt. rend. Laborat. Carlsb., **2,** 13 (1883)).

11. Boutroux, L., Sur la conservation des ferments alcooliques dans la nature. (Annal. des Scienc. Nat. [6]. Bot. **17,** 144 (1884)).

12. Amthor, Carl, Ueber den Saccharomyces apiculatus. (Zeitsch. f. physiol. Chemie, **12,** 558 (1888)).

13. Hansen, Emil Chr., Action des ferments alcooliques sur les diverses espèces de sucre. (Compt. rend. Laborat. Carlsb., **2,** 143 (1888)).

14. Grotenfelt, Gösta, Studien über die Zersetzungen der Milch. (Fortschritte der Medicin, No. 2 og 4, 1889).

15. Kayser, Études sur la fermentation du cidre. (Annal. de l'Inst. Pasteur, **4,** 321 (1890)).

16. Amthor, C., Ueber den Saccharomyces apiculatus. (Chemiker-Ztg., **15,** 670 (1891)).

17. Martinand, V., Influence des rayons solaires sur les levures que l'on rencontre à la surface des raisins. (Compt. rend. de l'Acad., **113,** 782 (1891)).

18. Cremer, Max, Ueber das Verhalten einiger Zuckerarten im thierischen Organismus. (Zeitschr. f. Biologie, **29,** 484 (1892)).

19. Mach, E. und Portele, K., Ueber die Gärung von Trauben- und Äpfelmost mit verschiedenen reingezüchteten Hefearten. (Die landw. Versuchsstat., **41,** 233 (1892)).

20. Voit, Fritz, Ueber das Verhalten der Galactose beim Diabetiker. (Zeitschrft. f. Biologie, **29,** 147 (1892)).

21. van Laer, H., La question des rapports de l'oxygène avec la levure. (Bull. de l'Assoc. belge des Chimistes, 1893, No. 3).

22. Lasché, A., Influence of certain temperatures upon different yeast forms contained in acid and alkaline nutrient media. (American Brewers' Review, **6,** 237 (1893)).

23. Beijerinck, M. W., Schizosaccharomyces octosporus, eine achtsporige Alkoholhefe. (Centralbl. f. Bakt. u. Par., **16,** 49 (1894)).

24. Fischer, Emil, und Thierfelder, Hans, Verhalten der verschiedenen Zucker gegen reine Hefen. (Ber. d. deutsch. chem. Ges., **27,** 2031 (1894)).

25. Cremer, M., Ueber die Umlagerung der Zuckerarten unter dem Einflusse von Ferment und Zelle; ein Beitrag zur Lehre von der Glykogenie und Gährung. (Zeitschr. f. Biologie, **31,** 183 (1895)).

26. Hansen, Emil Chr., Experimental studies on the variation of yeast-cells. (Annals of Botany, **9,** 549 (1895)).

27. Klöcker, Alb., Recherches sur les Saccharomyces Marxianus, Saccharomyces apiculatus et Saccharomyces anomalus. (Compt. rend. Laborat. Carlsb., **4,** 20 (1895)).

28. Lindner, P., Ueber eine in Aspidiotus Nerii parasitisch lebende Apiculatushefe. (Centralbl. f. Bakt. u. Par., 2. Abt., **1,** 782 (1895).

29. Nastukoff, M., Essais sur le pouvoir réducteur des levures pures. Moyens de le mesurer. (Annal. de l'Inst. Pasteur, **9,** 766 (1895)).

30. Rietsch et Herselin, Sur la fermentation apiculée et sur l'influence de l'aération dans les fermentations à température élevée. (Progrès agricole et viticole, 1895).

31. Wortmann, Julius, Anwendung und Wirkung reiner Hefen ind der Weinbereitung. Berlin 1895.

32. Bau, A., Ueber die Vergährbarkeit der Galaktose. (Zeitschr. f. Spiritusindustrie, 1896, p. 303).

33. Behrens, J., Die Infektionskrankheiten des Weines. (Centralbl. f. Bakt., Par. u. Inf., 2. Abt., **2,** 213 (1896)).

34. Berlese, Amedeo, Rapporti fra la vite ed i saccharomiceti. Sulla distribuzione dei fermenti alcoolici nella natura. I e II. (Rivista di patologia vegetale, **5,** 1896. — Firenze 1896).

35. Müller-Thurgau, H., Die Herstellung unvergorener und alkoholfreier Obst- und Traubenweine. 3. Aufl. Frauenfeld 1896.

36. Will, H. — (Zeitschr. f. das ges. Brauw., **19,** 675 (1896)).

37. Raciborski, M., Over het afsterven van jonge rietplanten veroorzaakt door eene gistsoort. (Mededeelingen van het Prof-Station voor suikerriet in West-Java te Kagok-Tegal. No. 33. Archief voor de Java-Suikerindustrie, 1898, Afl. 11).

38. Lendner, A., Sur quelques levures du vignoble genévois. (Archives des sciences physiques et naturelles [4], **9,** Avril, 1900).

39. Lindner, P., Gährversuche mit verschiedenen Hefen- und Zuckerarten. (Wochenschr. f. Brauerei, **17,** 713 (1900)).

40. Meissner, R., Anleitung zur mikroskopischen Untersuchung und Reinzüchtung der häufigsten im Most und Wein vorkommenden Pilze. Stuttgart 1901.

41. Seifert, W., Die Organismen der alkoholischen Gährung in der Weinbereitung. (Die Weinlaube, **33,** 2 (1901)).

42. Henneberg, W., Notiz zum Vorkommen von Glykogen bei Hefen. Saccharomyces apiculatus. (Wochenschr. f. Brauerei, **19,** 781 (1902)).

43. Rommel, W., Ueber einige Fruchthefen von Werder. (Wochenschr. f. Brauerei, **19,** 176 (1902)).

44. Wortmann, Julius, Ueber die Bedeutung der alkoholischen Gährung. (Weinbau u. Weinhandel, 1902).

45. Lindner, P., Sporenbildung bei Saccharomyces apiculatus. (Wochenschr. f. Brauerei, **20,** 505 (1903)).

46. Chapman, Alfred C., Wild yeast infection. (Journ. of the Inst. of Brewing, **10,** 382 (1904)).

47. Lindner, P., Neue Erfahrungen aus dem letzten Jahre in bezug auf Hefe und Gährung. (Jahrb. d. Versuchs- u. Lehranstalt f. Brauerei in Berlin, **7,** 441 (1904)).

48. Schander, R., Untersuchungen über Saccharomyces apiculatus Rees[s]. (Ber. d. kgl. Lehranst. f. Wein-, Obst- u. Gartenbau z. Geisenheim a. Rh. f. d. Etatsjahr 1903. — 1904, p. 123).

49. Armstrong, Edw. Frankland, Studies on enzyme action. VIII. The mechanism of fermentation. (Proc. of the Roy. Soc. of London. B., **76,** 600 (1905)).

50. Lindner, P., dans »Kryptogamenflora der Mark Brandenburg«, **7,** 1905, Heft I.

51. Lindner, P., Die neuen Forschungen auf dem Gebiete der Hefe und Gärung. (Jahrb. d. Versuchs- u. Lehranstalt f. Brauerei in Berlin, **8,** 463 (1905)).

52. Röhling, Alfred, Morphologische und physiologische Untersuchungen über einige Rassen des Saccharomyces apiculatus. Erlangen 1905.

53. Chapman, Alfred C., and Baker, F. G. S., An atlas of the Saccharomycetes, being a collection of photomicrographs representing the commoner and many of the rarer yeast species. London 1906.

54. Müller-Thurgau, H., Saccharomyces apiculatus. (F. Lafar, Handb. der technischen Mykologie, **4,** 315 (1905—07)).

55. Lindner, P., Übersicht über die Erfahrungen und Arbeiten des letzten Jahres. (Jahrb. d. Versuchs- u. Lehranstalt f. Brauerei in Berlin, **9,** 555 (1907)).

56. Kohl, G., Die Hefepilze, ihre Organisation, Physiologie, Biologie und Systematik, sowie ihre Bedeutung als Gärungsorganismen. Leipzig 1908.

57. de Kruyff, E., Untersuchungen über auf Java einheimische Hefearten. (Centralbl. f. Bakt., Par. u. Inf., 2. Abt., **21,** 616 (1908)).

58. Seiss, Clara, Vergleichende Versuche über den Einfluss der Temperatur auf Wachstum und Gärungsvermögen von Saccharomyces ellipsoideus und Saccharomyces apiculatus. (Ber. d. königl. Lehranstalt f. Wein-, Obst- u. Gartenbau zu Geisenheim a. Rh. f. d. Etatsjahr 1907. — 1908, p. 392).

59. Henneberg, Wilhelm, Gärungsbakteriologisches Praktikum, Betriebsuntersuchungen und Pilzkunde. Berlin 1909.

60. Lindner, P., Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben. 5te Aufl. Berlin 1909.

61. Will, H., Anleitung zur biologischen Untersuchung und Begutachtung von Bierwürze, Bierhefe, Bier und Brauwasser, zur Betriebskontrolle sowie zur Hefenreinzucht. München u. Berlin 1909.

62. Klöcker, Alb., Invertin- und Sporenbildung bei Saccharomyces apiculatus-Formen. (Centralbl. f. Bakt., Par. u. Inf., 2. Abt., **26,** 513 (1910)).

63. Rose, Ludwig, Beiträge zur Kenntnis der Organismen im Eichenschleimfluss. (Wochenschr. f. Brauerei, **27,** 525 (1910)).

64. Klöcker, Alb., Méthode pour reconnaître la présence de petites quantités d'alcool dans des liquides en fermentation, et quelques résultats qu'elle a permis d'obtenir. (Compt. rend. Laborat. Carlsb., **10,** 99 (1911)).

65. Zikes, H., Zur Nomenklaturfrage der Apiculatushefe (Centralbl. f. Bakt., Par. u. Inf., 2. Abt., **30,** 145 (1911)).

66. Guilliermond, Alexandre, Les levures. Paris 1912.

EXPLICATION DES FIGURES.

PLANCHES II à VIII.

Toutes les figures reproduites ont un grossissement linéaire de 500 fois, quand rien d'autre n'est annoté.

Planche II.

Fig. 1. Pseudosaccharomyces apiculatus (Reess-Hansen). Cellules vieilles d'un jour dans du moût à 25°.

— 2. Du même. Cellules vieilles de trois jours dans du moût à 33°.

— 3. Ps. austriacus n. sp. Cellules vieilles d'un jour dans du moût à 25°.

— 4. Du même. Cellules vieilles de trois jours dans du moût à 33°.

— 5. Ps. africanus n. sp. Cellules vieilles d'un jour dans du moût à 25°.

— 6. Du même. Cellules vieilles de trois jours dans du moût à 33°.

Planche III.

— 7. Ps. corticis n. sp. Cellules vieilles d'un jour dans du moût à 25°.

— 8. Du même. Cellules vieilles de trois jours dans du moût à 33°.

— 9. Ps. Mülleri n. sp. Cellules vieilles d'un jour dans du moût à 25°.

— 10. Du même. Cellules vieilles de trois jours dans du moût à 33°.

— 11. Ps. Lindneri n. sp. Cellules vieilles d'un jour dans du moût à 25°.

— 12. Du même Cellules vieilles de trois jours dans du moût à 33°.

Planche IV.

Fig. 13. Ps. germanicus n. sp. Cellules vieilles d'un jour dans du moût à 25°.

— 14. Du même. Cellules vieilles de trois jours dans du moût à 33°.

— 15. Ps. Jenseni n. sp. Cellules vieilles d'un jour dans du moût à 25°.

— 16. Du même. Cellules vieilles de trois jours dans du moût à 35°.

— 17. Ps. javanicus n. sp. Cellules vieilles d'un jour dans du moût à 25°.

— 18. Du même. Cellules vieilles de trois jours dans du moût à 35°.

Planche V.

— 19. Ps. malaianus n. sp. Cellules vieilles d'un jour dans du moût à 25°.

— 20. Du même. Cellules vieilles de trois jours dans du moût à 35°.

— 21. Ps. Lafari n. sp. Cellules vieilles d'un jour dans du moût à 25°.

— 22. Du même. Cellules vieilles de trois jours dans du moût à 35°.

— 23. Ps. Willi n. sp. Cellules vieilles d'un jour dans du moût à 25°.

— 24. Du même. Cellules vieilles de trois jours dans du moût à 35°.

Planche VI.

— 25. Ps. antillarum n. sp. Cellules vieilles d'un jour dans du moût à 25°.

— 26. Du même. Cellules vieilles de trois jours dans du moût à 35°.

— 27. Ps. occidentalis n. sp. Cellules vieilles d'un jour dans du moût à 25°.

— 28. Du même. Cellules vieilles de trois jours dans du moût à 35°.

— 29. Ps. santacruzensis n. sp. Cellules vieilles d'un jour dans du moût à 25°.

— 30. Du même. Cellules vieilles de trois jours dans du moût à 35°.

Planche VII.

Fig. 31. Ps. indicus n. sp. Cellules vieilles d'un jour dans du moût à 25°.

— 32. Du même. Cellules vieilles de trois jours dans du moût à 35°.

— 33. Hanseniaspora valbyensis n. sp. Cellules vieilles d'un jour dans du moût à 25°.

— 34. Du même. Cellules vieilles de trois jours dans du moût à 30°.

— 35. Du même. Jeunes spores sans filet saillant. Culture de spores âgée de 14 jours, engendrée sur du moût gélatiné additionné d'agar.

— 36. Du même. Spores plus vieilles munies d'un filet saillant. Culture de spores âgée de deux mois, engendrée sur du moût gélatiné additionné d'agar.

Planche VIII.

— 37. Du même. Jeunes spores sans filet saillant. Culture de spores âgée de 14 jours, engendrée sur du moût gélatiné additionné d'agar. $^{1500}/_{1}$.

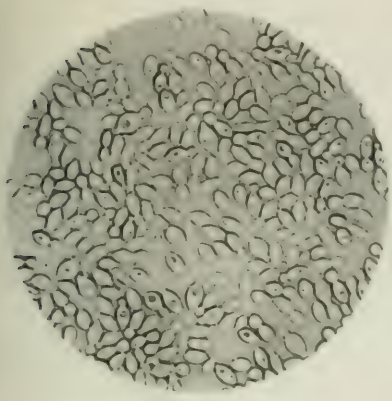
— 38. Du même. Vieilles spores munies d'un filet saillant. Culture de spores âgée de quatre mois, engendrée sur du moût gélatiné additionné d'agar. $^{1500}/_{1}$.

— 39. Du même. Jeunes spores sans filet saillant. Culture de spores âgée de 14 jours, engendrée sur du moût gélatiné additionné d'agar. $^{1000}/_{1}$.

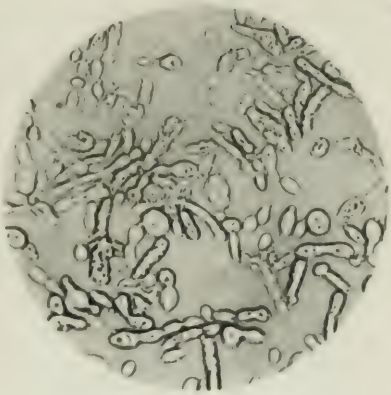
— 40. Du même. Deux spores sortant de la cellule mère. $^{1500}/_{1}$.

— 41. Du même. Deux spores, dont l'une est gonflée, gonflement indiquant que le bourgeonnement va commencer. $^{1500}/_{1}$.

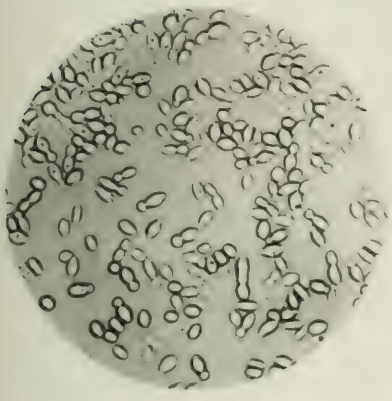
— 42. Du même. Deux spores qui chacune ont poussé un bourgeon. $^{1500}/_{1}$.



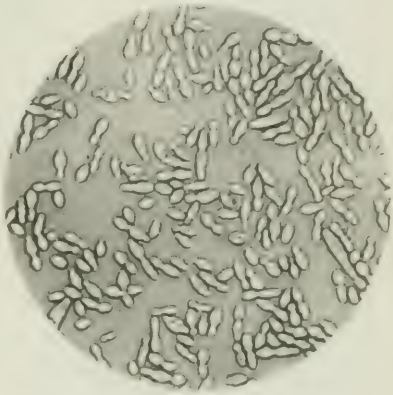
1



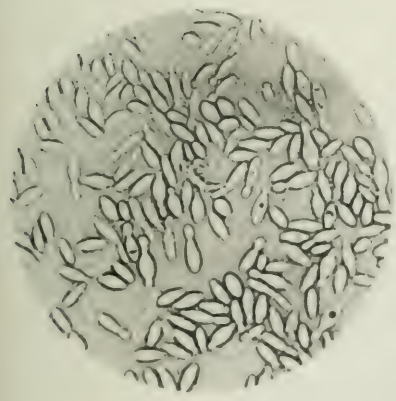
2



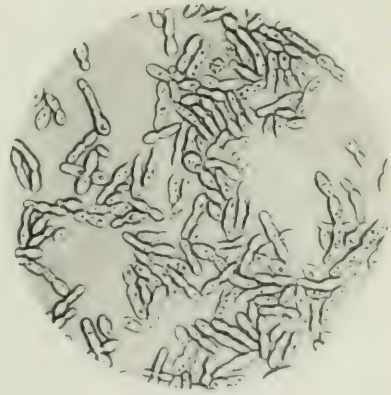
3



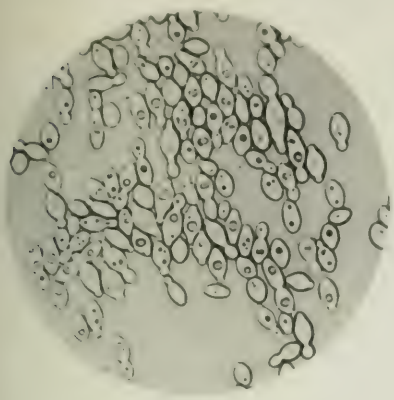
4



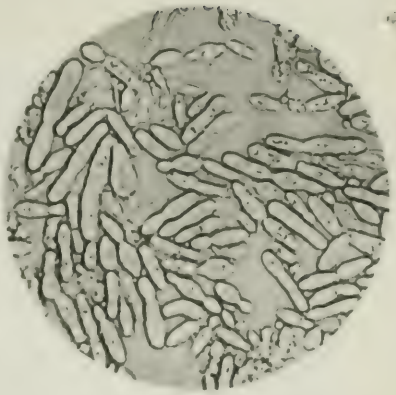
5



6

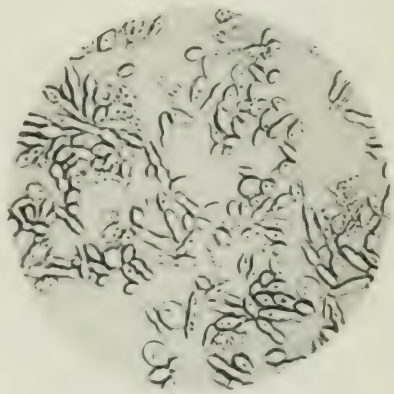


7

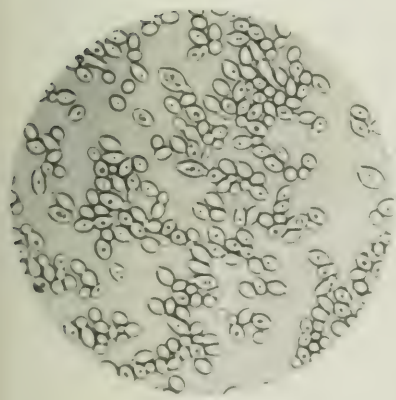


8

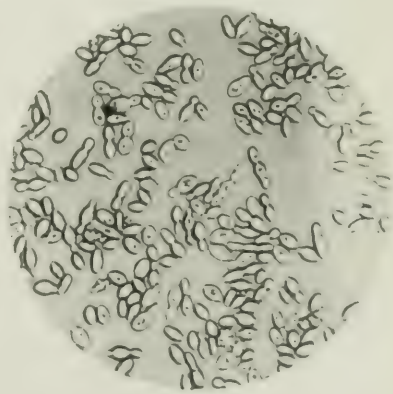
9



10

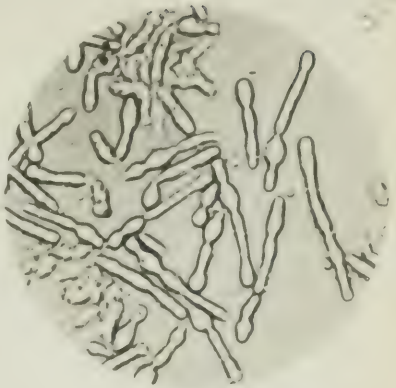


11

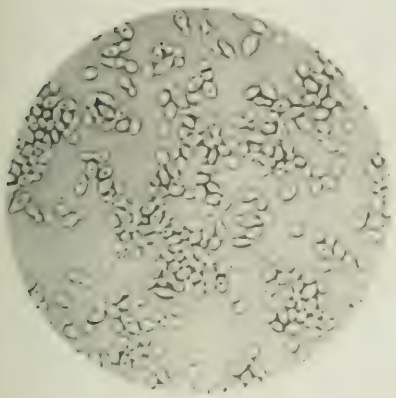


12

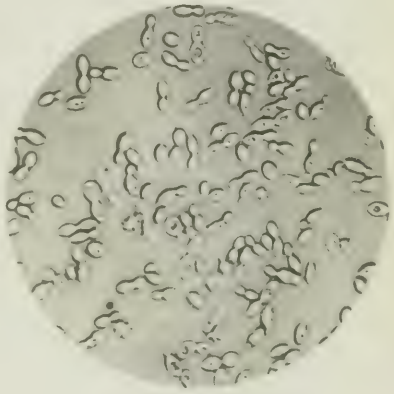
13



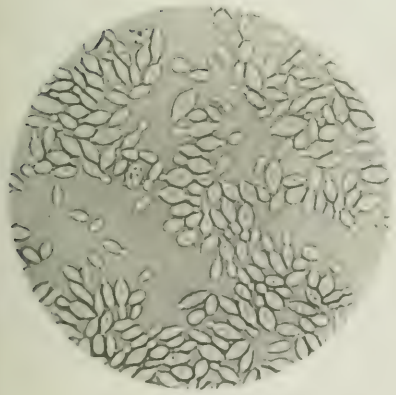
14



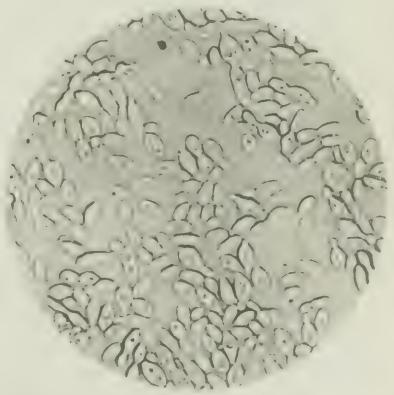
15



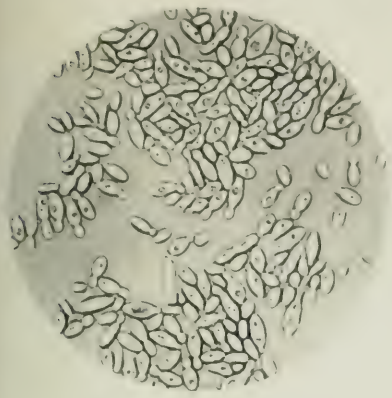
16



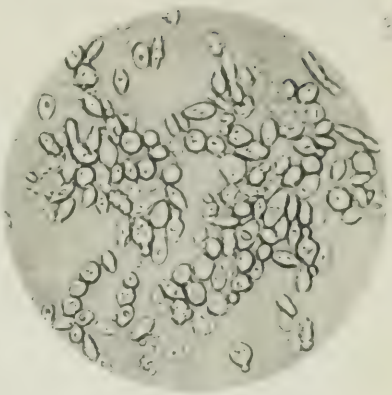
17



18

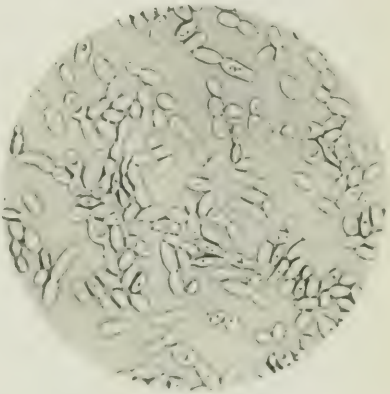


19

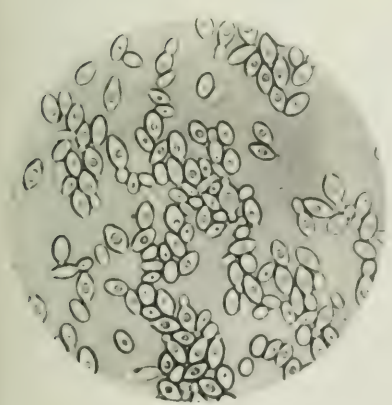


20

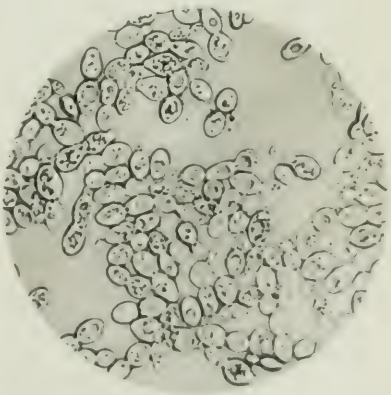
21



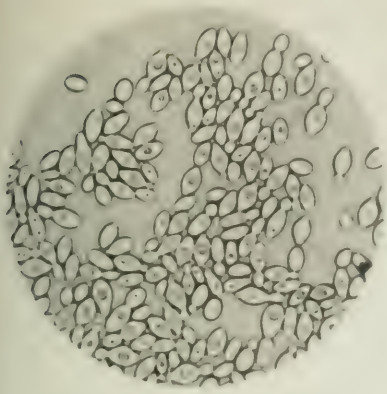
22



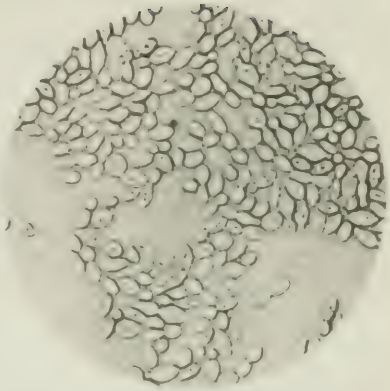
23



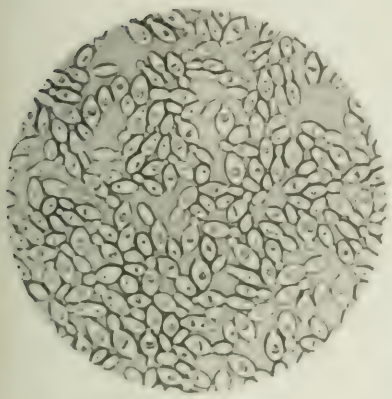
24



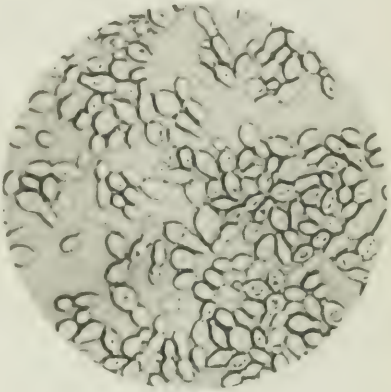
25



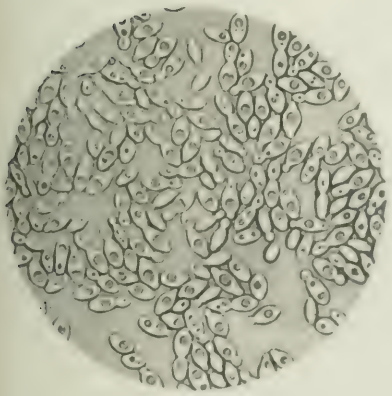
26



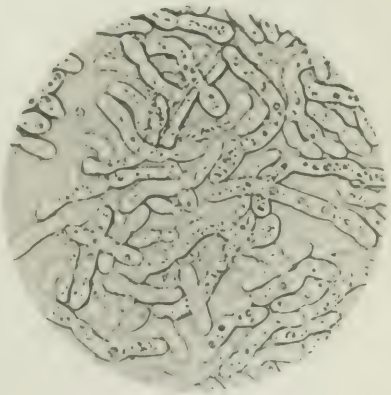
27



28

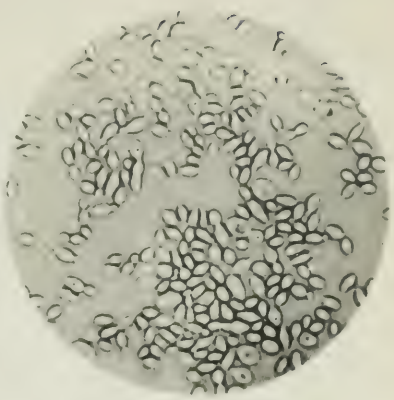


29

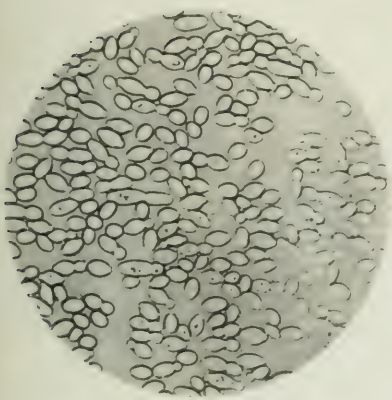


30

31

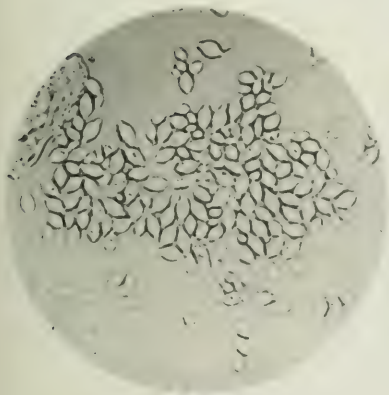


32

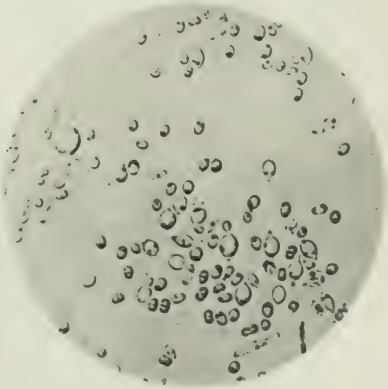


33

34



35



36

37

38

39

40

41

42

JOH. KJELDAHL MONUMENT

FOTOTYPI. PACHT & CRONE.

EMIL CHR. HANSEN MONUMENT

MONUMENTS ÉRIGÉS A LA MÉMOIRE

DE

JOHAN KJELDAHL ET EMIL CHR. HANSEN.

Immédiatement après la mort de JOHAN KJELDAHL le 18 juillet 1900, le désir fut exprimé de différents côtés, de voir élever un monument en son honneur, là où il avait accompli l'œuvre de sa vie. Cependant, diverses circonstances firent que ce projet dut rester en suspens. Il fut repris après le décès de EMIL CHR. HANSEN, le 27 août 1909, alors que se fit jour la proposition d'ériger un monument à ce grand pionnier de l'étude de la microbiologie et de la technologie des fermentations.

Deux comités se formèrent sous la présidence de M. le professeur et Dr S. M. Jörgensen, président du Conseil d'administration du Laboratoire de Carlsberg, et de nombreux savants du Danemark et d'autres pays donnèrent avec empressement leur adhésion à la pensée d'élever un monument à ces deux investigateurs à l'aide d'une souscription internationale. et, en même temps que les appels ci-dessous étaient adressés aux membres d'institutions scientifiques, ainsi qu'aux personnalités sur la reconnaissance desquels on pensait pouvoir compter, le Conseil d'administration du Laboratoire de Carlsberg, au nom du Laboratoire, promettait un don de 20000 couronnes pour aider à la réalisation de ces projets.

Depuis plus d'un quart de siècle, les Méthodes de KJELDAHL pour le dosage de l'azote dans les matières organiques et pour celui des sucres, comme aussi ses recherches sur les enzymes, sont du domaine public.

La valeur et l'importance de sa méthode pour le dosage de l'azote etant universellement reconnues, il est, pensons-nous, inutile d'insister davantage sur l'application très étendue qu'elle a trouvée, aussi bien dans les travaux scientifiques qu'en pratique. Nous mentionnerons seulement le grand développement accompli depuis une vingtaine d'années dans le domaine de la Chimie physiologique, développement qui n'eût guère été possible sans une méthode de travail aussi précise et aussi simple que celle de KJELDAHL; nous mentionnerons également les services rendus par cette même méthode dans la détermination de la valeur nutritive des aliments et des matières fourragères.

Sa méthode pour le dosage des sucres n'est pas d'une importance moindre: elle est devenue indispensable à tous ceux qui ont à faire des dosages exacts d'un sucre.

Par ses remarquables recherches sur la nature et l'action des enzymes, il a été un des pionniers de la science dans ce domaine.

Par tous ces travaux de réelle valeur, JOHAN KJELDAHL a inscrit son nom dans l'histoire de la Science.

Et c'est pourquoi nous soussignés avons pensé qu'il serait bien naturel d'élever un monument à JOHAN KJELDAHL au lieu même où il réalisa son œuvre: un buste ou un relief en bronze reproduisant ses traits si caractéristiques, érigé dans le parterre situé devant le Laboratoire de Carlsberg. Dans ce but, nous nous permettons de faire appel aux Institutions, aux Savants et aux Industriels aux travaux desquels l'œuvre de KJELDAHL a été utile, et nous osons espérer qu'ils voudront bien participer à la réalisation de ce projet.

Après trente années de recherches importantes et fructueuses, le Prof. et Dr EMIL CHR. HANSEN, chef du service physiologique du Laboratoire de Carlsberg, à Copenhague, est décédé le 27 août 1909.

L'œuvre initiatrice d'EMIL CHR. HANSEN est bien connue et appréciée, non seulement en Danemark, sa patrie, mais, on peut le dire, dans le monde entier.

Conscient du but qu'il se proposait, HANSEN, par ses investigations pénétrantes et ses méthodes de recherche, a exercé une grande influence sur le développement de la microbiologie scientifique et, par cela même, il s'est élevé un superbe monument dans les annales de la science et de l'industrie; ses travaux sur les organismes de la fermentation peuvent être considérés comme une des bases de l'industrie de la fermentation. Pour le démontrer, il suffit de citer, parmi ses œuvres, les deux principales: «Recherches dans la pratique de l'industrie de la fermentation» et «Recherches sur la physiologie et la morphologie des levures alcooliques».

Pensant nous faire les interprètes de tous ceux qui doivent de la reconnaissance à HANSEN pour la tâche ardue et méritoire à laquelle il a voué la plus grande partie de sa vie, nous avons conçu le projet de lui élever un monument par souscription, sur le lieu même de ses travaux; le parterre situé devant le laboratoire de Carlsberg, nous paraîtrait tout indiqué à cet effet.

Dans le cas où la souscription projetée atteindrait un chiffre plus élevé que la valeur du monument, nous ajouterions ce surplus au Legs EMIL CHR. HANSEN pour l'encouragement des recherches microbiologiques.

HANSEN, voulant, pour ainsi dire, participer encore après sa mort à l'œuvre qui fut celle de sa vie, a, par testament, légué une bonne partie de sa fortune, — soit 40 à 50,000 couronnes, — capital dont les intérêts seront versés à titre de prix aux auteurs des meilleurs travaux dans le domaine de la microbiologie.

Voici ce que dit à ce sujet l'introduction de ses dispositions testamentaires: «Comme c'est au succès dont j'ai été favorisé dans mes recherches microbiologiques que je dois ma fortune, je désire qu'une partie de cette fortune soit employée à aider ceux qui, après moi, voudront pousser plus avant les recherches dans ce domaine. Dans ceux-là, je comprends, non seulement mes compatriotes, mais, au même point, tous les étrangers.»

La généreuse idée de HANSEN ne mérite-t-elle pas l'appui de tous ceux qu'intéresse la science des infiniment petits, tant

au point de vue théorique que sous le rapport de son application pratique à l'industrie.

C'était — et ce devait être — deux cercles différents dans lesquels nous pouvions nous attendre à ce que notre pensée trouvât un écho, et notre attente ne fut pas vaine, car, comme on le verra par le tableau ci-après, on répondit généreusement a notre appel, si bien que, maintenant, deux superbes monuments, hommage rendu a l'œuvre des deux savants danois, attestent la gratitude des nations.

Nombre [1]) des souscriptions reçues pour	Danemark	Norvège	Suède	Finlande	Russie	Autriche-Hongrie	Allemagne	Suisse	France	Angleterre	Hollande	Belgique	Italie	Roumanie	Amérique	Japon	Total
le monument de KJELDAHL	39	4	5	1	30	12	27	3	19	4	2	3	-	1	1	1	152
le monument de HANSEN. .	46	4	12	1	6	22	47	3	8	8	3	4	3	-	8	1	176

L'exécution des monuments a été confiée à M. Carl Brummer, architecte qui a donné au monument de KJELDAHL la forme d'une puissante colonne de marbre blanc, de belle allure, haute d'environ cinq mètres, et couronnée par une allégorie en bronze représentant l'Energie chimique. Au milieu de la colonne est un haut-relief en bronze reproduisant les traits de KJELDAHL. Ce médaillon a été modelé par M. Th. Bærentzen, qui pour ce travail s'est basé en grande partie sur une plaquette modelée en son temps par M. A. P. Weis.

Le monument de HANSEN, également en marbre blanc, est formé par un banc antique sur lequel est posée une statue en bronze due a Stephan Sinding, et représentant un homme assis, «Le Penseur», qui fixe son regard profond sur un des côtés du banc de marbre, où se trouve un bas-relief montrant de

[1]) Plusieurs des souscriptions ci-dessus mentionnées proviennent de sociétés et d'institutions, comme aussi de souscriptions locales.

nombreux travailleurs, au-dessous desquels on lit, en danois, le Proverbe bien connu de Salomon: Va vers la fourmi et deviens sage. Au-dessus du banc s'élève une haute colonne de marbre, quadrangulaire, et ornée en son milieu d'un médaillon en bronze exécuté par Ludvig Brandstrup et reproduisant les traits de EMIL CHR. HANSEN.

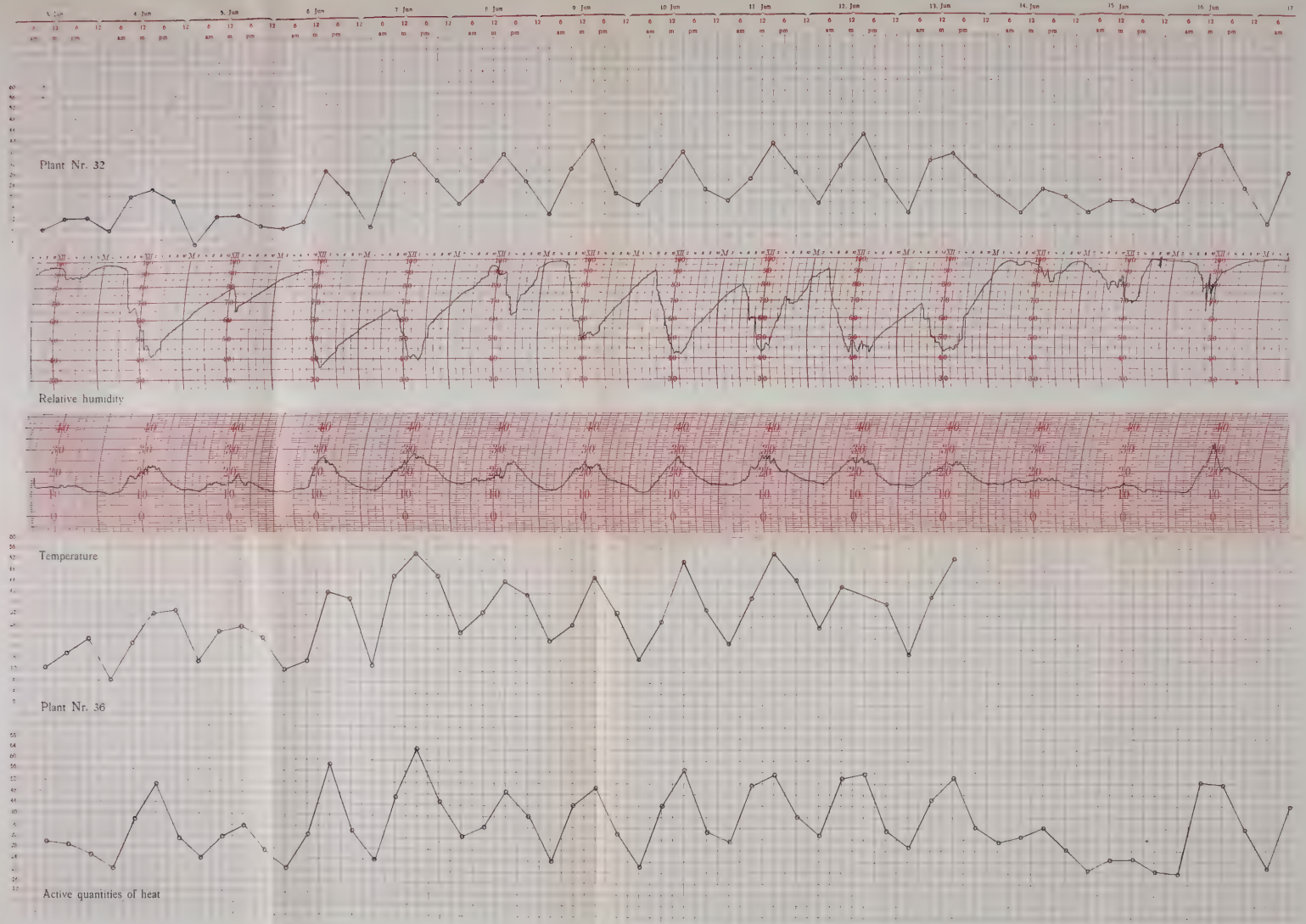
Les débours occasionnés par ces monuments se sont montés pour le premier à 8262 couronnes 04 œres, et à 21623 couronnes 94 œres pour le second. Le surplus des souscriptions envoyées pour le monument de HANSEN — 18129 couronnes 18 œres — a été versé au HANSEN-FONDET (Fondation HANSEN).

On réussit à avoir les monuments achevés pour le Centenaire de J. C. JACOBSEN, le 2 septembre 1911, et l'inauguration en eut lieu au matin de ce jour.

Erigés dans le parterre qui s'étend devant le Laboratoire de Carlsberg, ils se dressent aux côtés du monument élevé à J. C. JACOBSEN, dont voici l'inscription en traduction: Les ouvriers et «les fonctionnaires du Vieux-Carlsberg et du Laboratoire se sont «joints aux chefs de métiers de la Brasserie et à l'Administration «de la DONATION CARLSBERG pour élever ce monument à la «mémoire de J. C. JACOBSEN, le fondateur de la Brasserie Carls-«berg, le généreux créateur de la Donation Carlsberg, le patriote «dévoué». Aux générations lointaines, ces monuments diront qu'il fut donné à JOHAN KJELDAHL et à EMIL CHR. HANSEN d'être les premiers à jeter de l'éclat sur le Laboratoire de Carlsberg et à l'amener à prendre la position élevée rêvée par J. C. JACOBSEN. Et rappelant, à travers tous les âges, l'hommage rendu à leur œuvre par les contemporains de ces deux savants, ils rediront à tous:

Honneur soit à leur mémoire.

Plate III

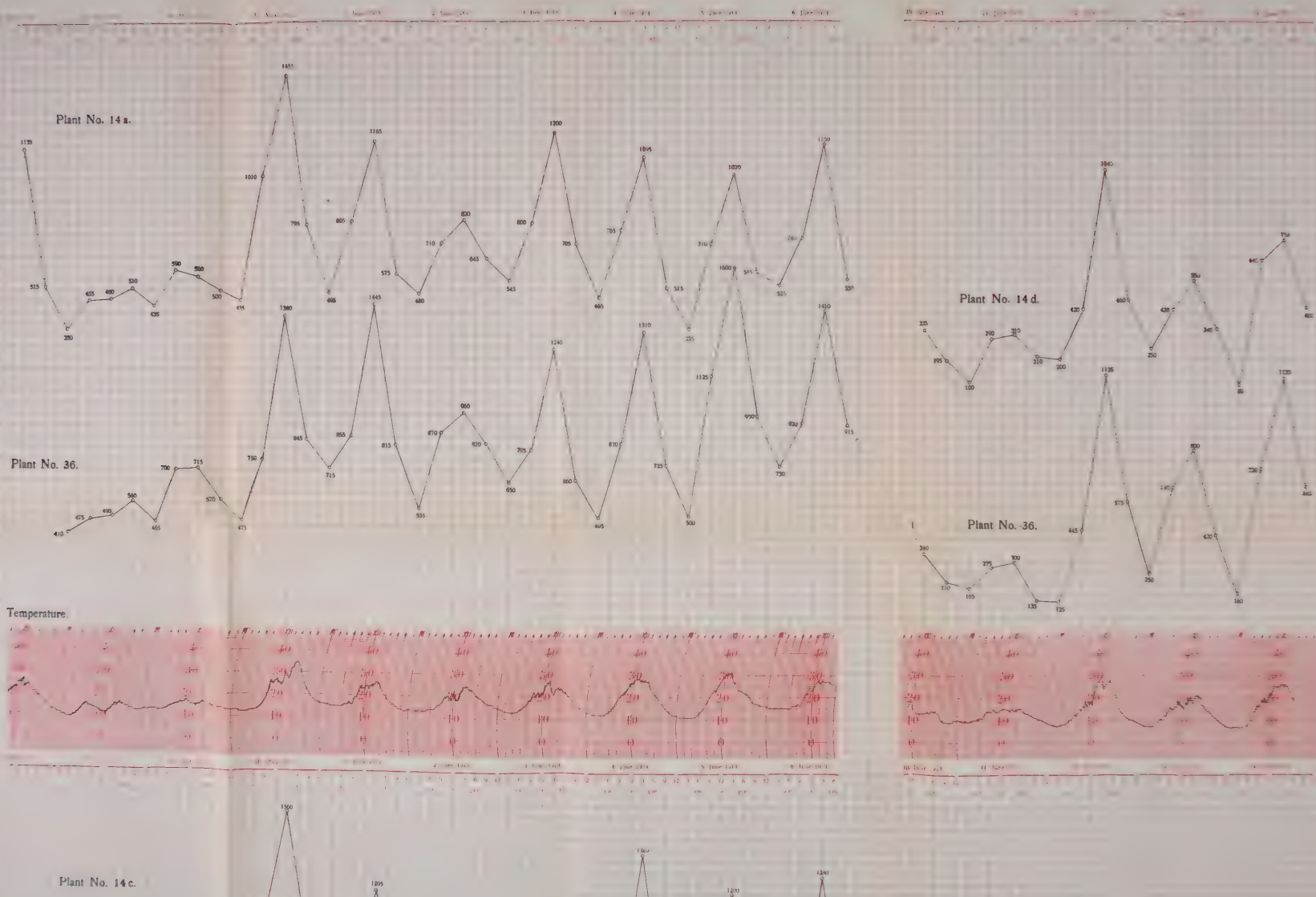

Plant Nr. 32
Relative humidity
Temperature
Plant Nr. 36
Active quantities of heat

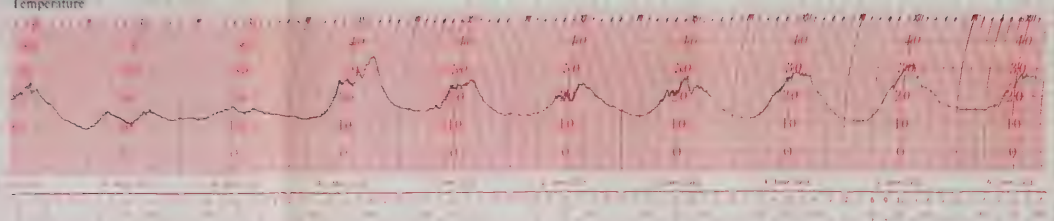
Plant Nr. 66
Temperature

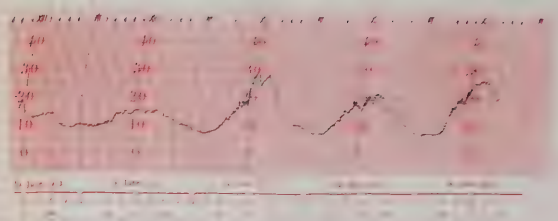
Plate II

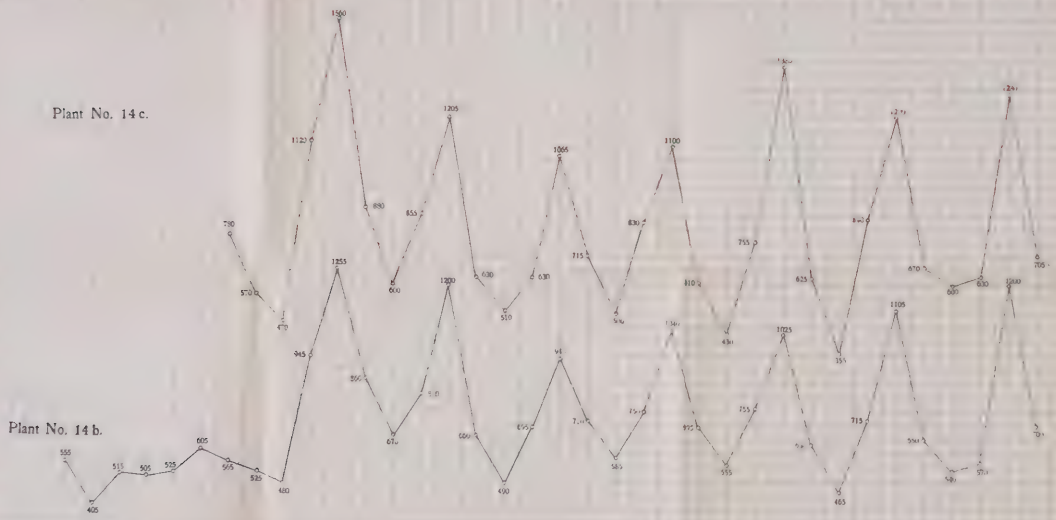
Plant Nr. 17
Active quantities of heat.

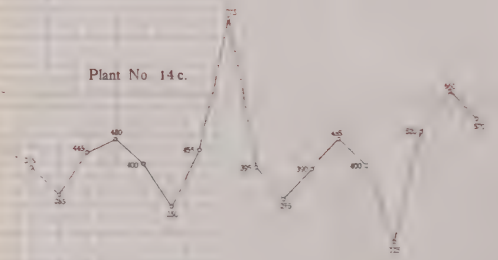
Plate IV

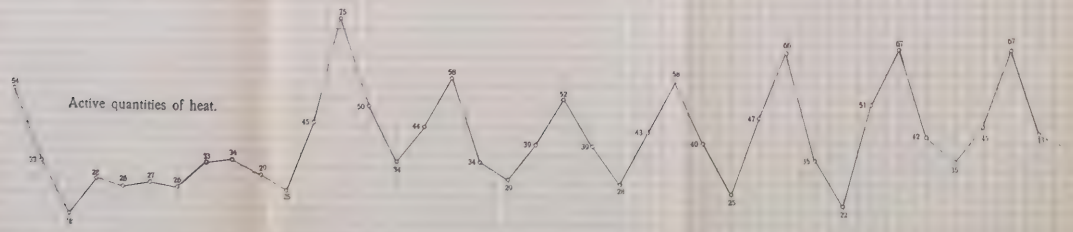

Plant No. 14 a.
Plant No. 36.
Temperature.
Plant No. 14 d.
Plant No. 36.
Plant No. 14 c.


Temperature




Plant No. 14 c.
Plant No. 14 b.


Plant No. 14 c.


Active quantities of heat.

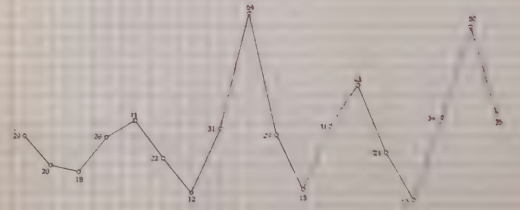
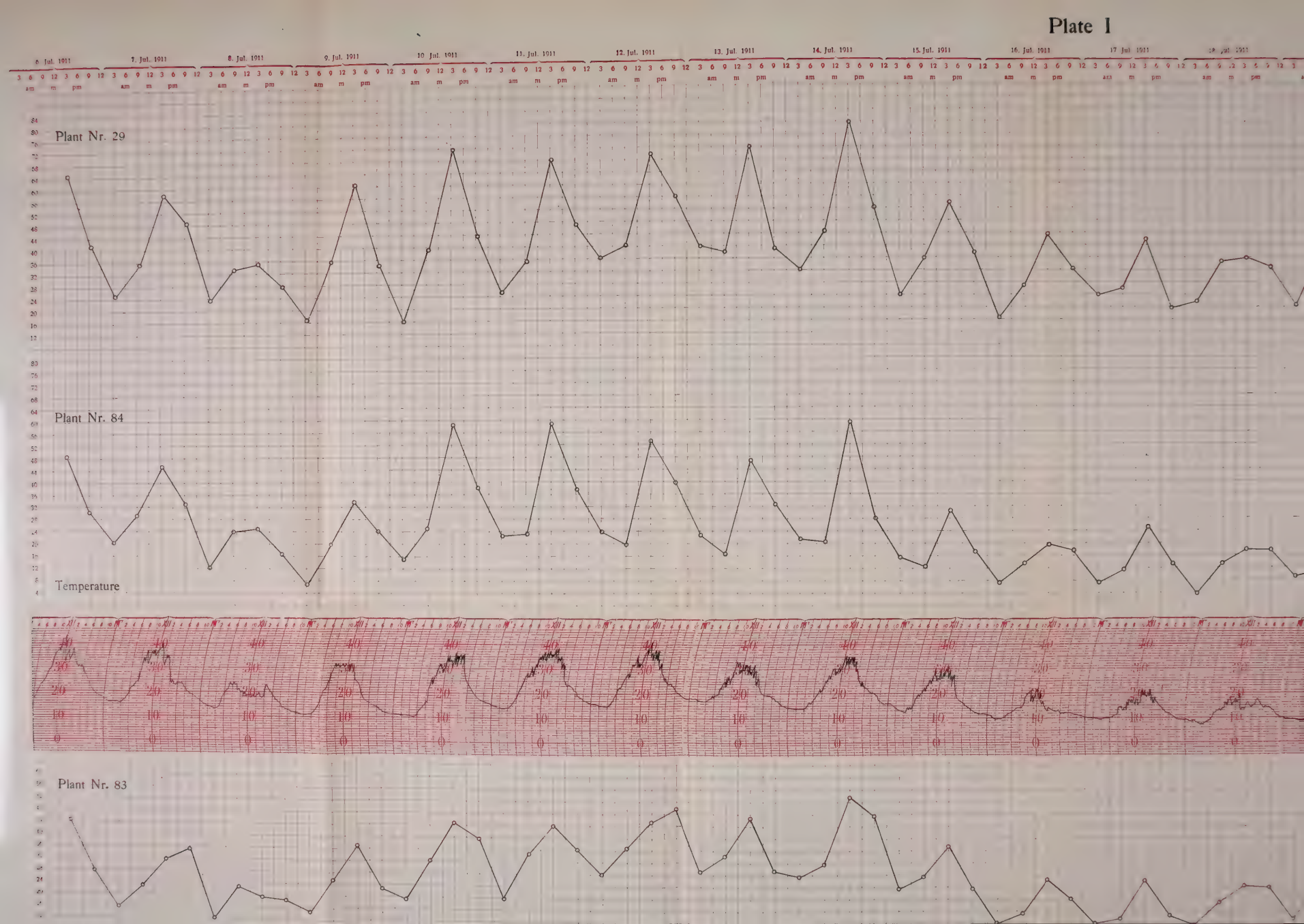
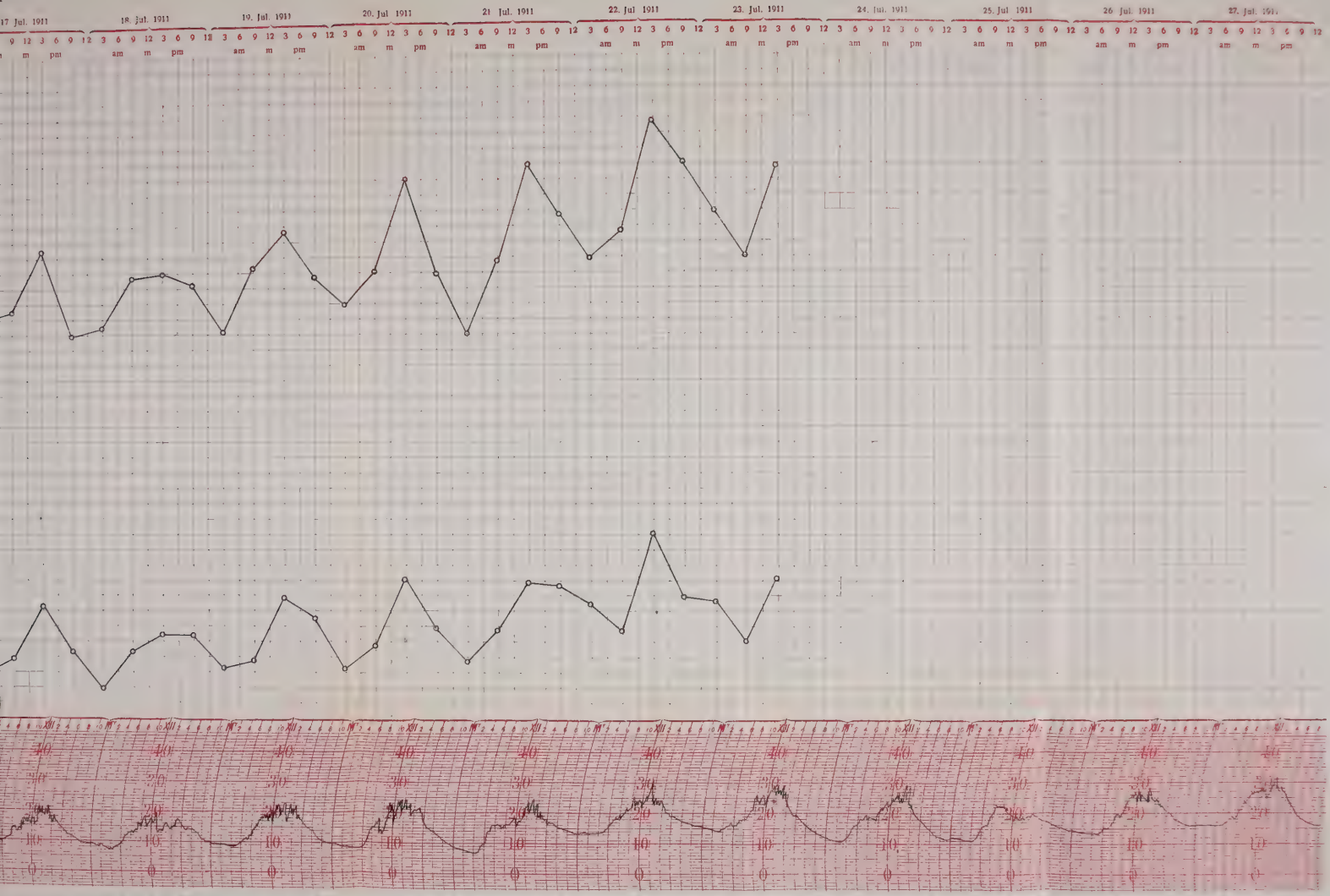
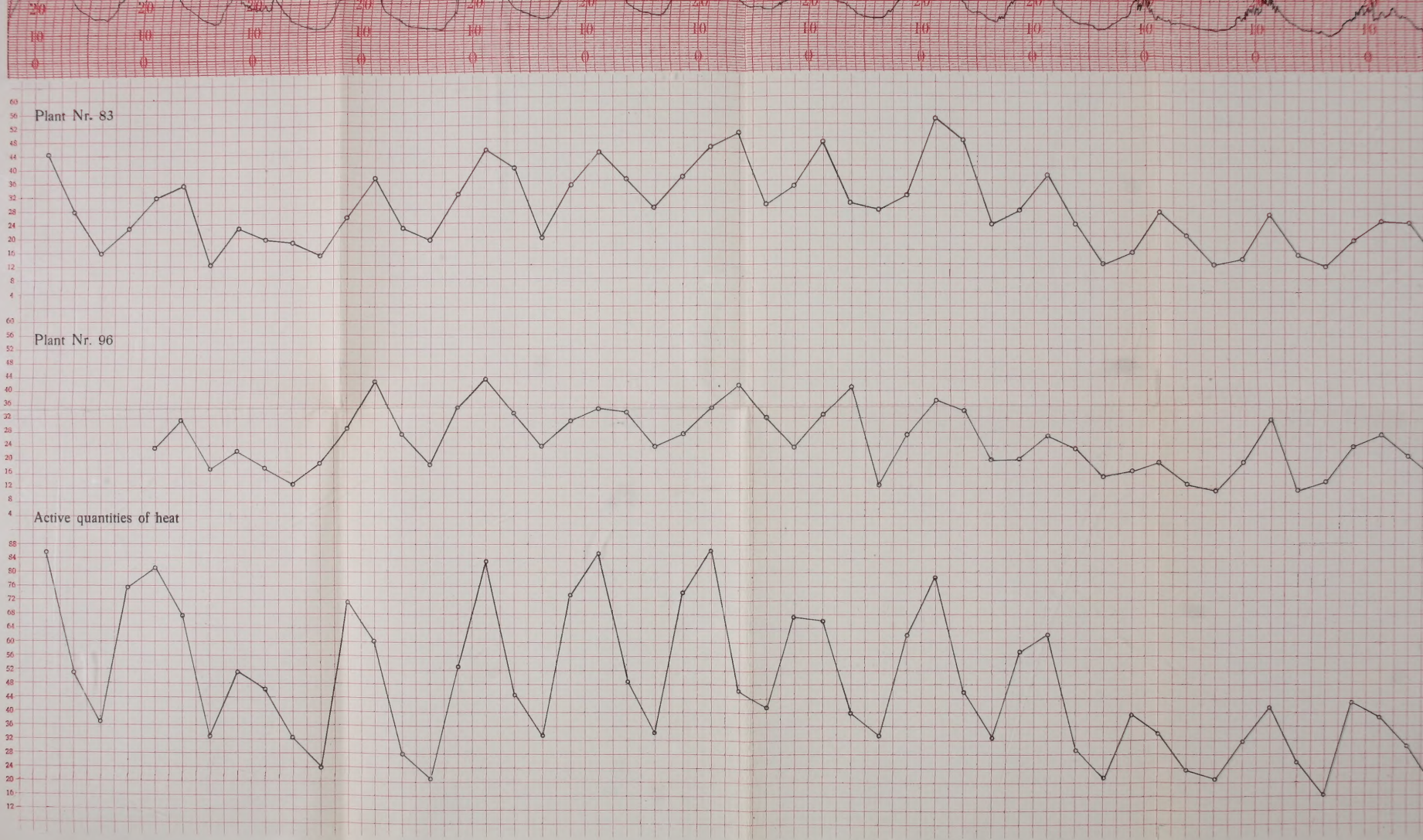
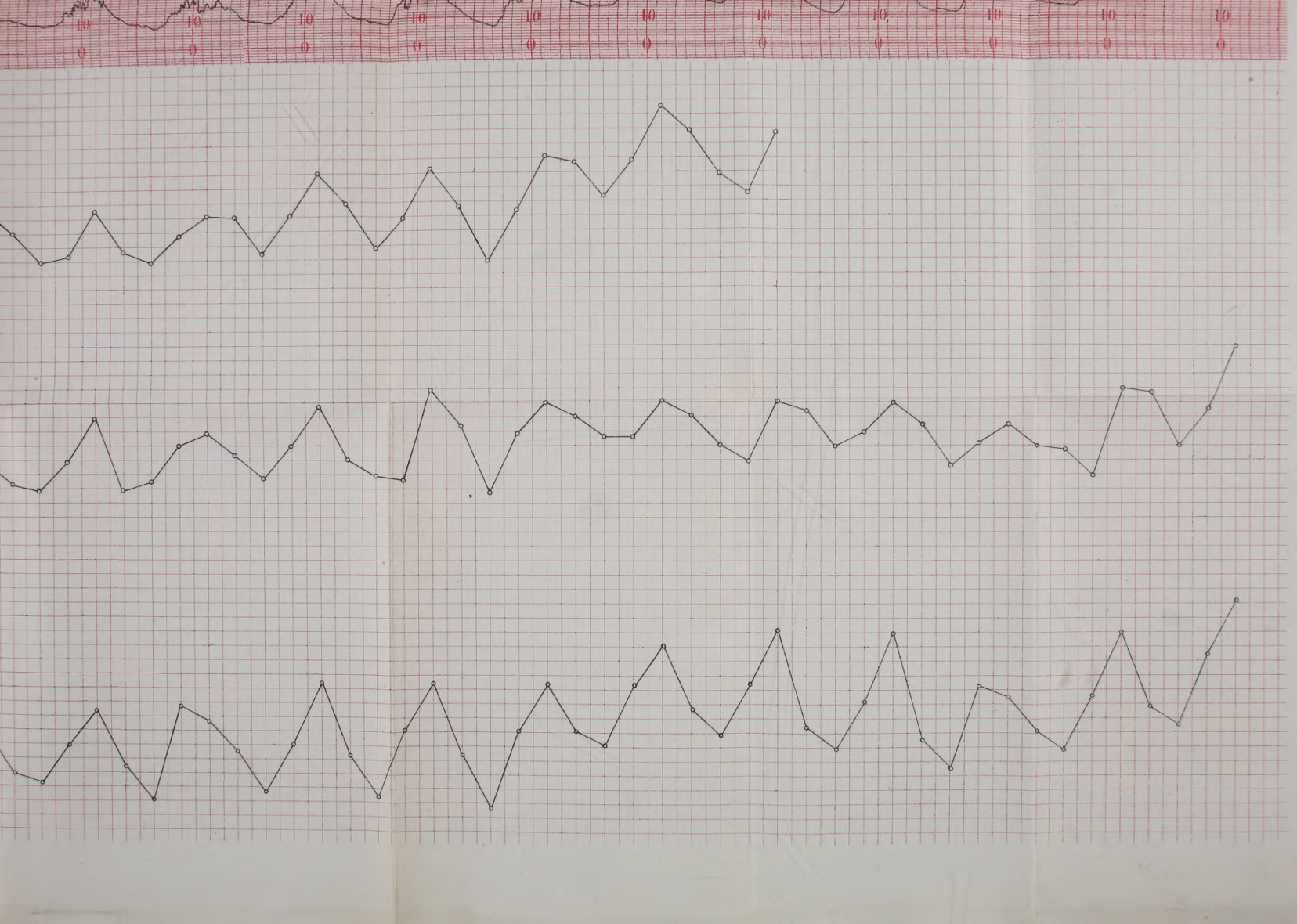


Plate I


6. Jul. 1911
7. Jul. 1911
8. Jul. 1911
9. Jul. 1911
10. Jul. 1911
11. Jul. 1911
12. Jul. 1911
13. Jul. 1911
14. Jul. 1911
15. Jul. 1911
16. Jul. 1911
17 Jul 1911
am
m
pm
Plant Nr. 29
Plant Nr. 84
Temperature
Plant Nr. 83


17. Jul. 1911
18. Jul. 1911
19. Jul. 1911
20. Jul. 1911
21. Jul. 1911
22. Jul. 1911
23. Jul. 1911
24. Jul. 1911
25. Jul. 1911
26. Jul. 1911
27. Jul. 1911
am
m
pm


Plant Nr. 83
Plant Nr. 96
Active quantities of heat



TP
500
C95
v.9-10
Carlsberg Laboratoriet, Copenhagen.
Comptes rendus des travaux

BINDING LIST JUN 1 1932

TP
500
C35
v.9-10

Carlsberg Laboratoriet,
Copenhagen
Comptes rendus des travaux

Engineering

PLEASE DO NOT REMOVE
CARDS OR SLIPS FROM THIS POCKET

UNIVERSITY OF TORONTO LIBRARY

ENGIN STORAGE